

**DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA Y PARASITOLOGÍA
UNIVERSIDAD DE SANTIAGO DE COMPOSTELA**

DETECCION DE MAMITIS EN EL GANADO BOVINO

Memoria que para optar al grado
de Doctor presenta
MANUEL VAZQUEZ BRAÑAS

Santiago, septiembre 1996

El Dr. JAIME FABREGAS CASAL, Profesor Titular del Departamento de Microbiología y Parasitología de la Universidad de Santiago

INFORMA :

Que el licenciado en Ciencias Biológicas y alumno de Tercer Ciclo del Programa de Doctorado Avances en Microbiología y Parasitología, D. MANUEL VAZQUEZ BRAÑAS, ha realizado bajo mi dirección y la del Jefe de la Sección de Sanidad Animal del Centro de Investigaciones Agrarias de Mabegondo (CIAM), D. EUGENIO REY FERNANDEZ, en el Departamento de Microbiología y Parasitología y en el Laboratorio de Enfermedades Infecciosas del CIAM el trabajo con el título **DETECCION DE MAMITIS EN EL GANADO BOVINO**, que, una vez concluido, AUTORIZO para su presentación para optar al grado de Doctor.

Y para que así conste, se firma la presente en Santiago, a veinticuatro de septiembre de mil novecientos noventa y seis.

Fdo: Jaime Fábregas Casal

Dedicada

A mi mujer

A mi hija

INDICE	PAG N°
INTRODUCCION	1
* Conceptos generales sobre mastitis	1
* Agentes etiológicos de la mastitis	4
* Conceptos epidemiológicos básicos de la mastitis	6
* Técnicas de detección de IMIs productoras de mastitis:	10
= Análisis microbiológico	11
= Pruebas serológicas	13
= Tests de biología molecular: pruebas de ADN	18
= Recuento de células somáticas en tanque	21
= Pruebas físico-químicas: conductividad, NAGasa...	26
OBJETIVOS	34
MATERIAL Y METODOS	35
* Metodología de muestreo	36
* Método de recogida de datos epidemiológicos:	37
= Naturaleza de las variables estudiadas	37
* Análisis de los datos	38
* Procesamiento de las muestras y técnicas de análisis	39
= Análisis bacteriológico	39
= Recuento de células somáticas	44
= ELISA	44
* Análisis estadístico	49

RESULTADOS	50
DISCUSION	61
CONCLUSIONES	74
AGRADECIMIENTOS	75
BIBLIOGRAFIA	77
ANEXOS	76

Tabla 1, 2 Y 3.

Figuras 1,2 y 3.

Análisis estadístico: tablas

Hojas de cálculo EXCEL 2.xls, 3.xls y 4.xls

ABREVIATURAS Y GLOSARIO

BTSCC: Recuento de células somáticas en tanque de mezcla

CAMP: Factor o reacción que indica la capacidad y el tipo de hemólisis de una cepa de estreptococo. Normalmente se aplica en los grupos serológicos B y C.

CMT: Test California de Mamitis

DAB: Diaminobenzidina

D.O.: Densidad óptica

Duración de una IMI: N° de días entre la primera y la última lactaciones con infección más 1 día.

ELISA: Siglas de enzyme linked immunosorbent assay

IgG: Inmunoglobulina G

IMI: Infección intramamaria en la vaca

Índice de una IMI: Cantidad de nuevas IMIs detectadas durante un tiempo definido.

Incidencia: Concepto epidemiológico que señala el porcentaje de cuarterones de la ubre con un aislado bacteriano determinado al menos una vez durante la lactación.

IQR: ratio o cociente intercuarterón en la ubre de la vaca

MIC: Concentración mínima inhibitoria de un antimicrobiano

NAGasa: N-acetil glucosiminidasa

PBS: Tampon fosfato salino

PEC: Polietilenglicol

PMN: Leucocitos polimorfonucleares

Prevalencia: Concepto epidemiológico que señala el porcentaje de muestras con un aislado bacteriano dado.

QFM: Primera leche de cuarterón en un ordeño.

SCC: Recuento de células somáticas

SDS-PAGE: Electroforesis en gel de γ -poliacrilamida con lauril sulfato sódico

Sephacryl: Gel que actúa como matriz en cromatografía de exclusión

Sepharose: Matriz en cromatografía de afinidad

TBS: Tampón tris salino

TBS-T: Tampón tris salino con Tween 20

ufc: Unidades formadoras de colonias

UTM: Leche total de la ubre en un ordeño

WGA: Aglutinina de germen de trigo

WMT: Test de Wiscosin para mamitis (análogo al CMT)

INTRODUCCION

Conceptos generales sobre mastitis.

La mastitis es la enfermedad más costosa que afecta al ganado bovino. Varios estudios (Janzen, 1970; Natzke et al, 1972; Wood and Booth, 1983; Deluyker et al, 1991) han demostrado las pérdidas generadas en la producción lechera debidas a la mastitis. Lucey and Rowlands describieron en 1984 una técnica que valoraba la reducción en el rendimiento lechero y los cambios en la forma de la curva de lactación asociados a la mastitis clínica.

Las infecciones intramamarias que desembocan en una mastitis son parte de un complejo etiológico de enfermedad multifactorial, resultado de la combinación de diversos agentes con el hospedador (la vaca lechera) bajo diferentes situaciones ambientales (Pearson et al, 1972) (Stovlbaek-Pedersen, 1975). Además, la frecuencia de la enfermedad continúa incrementándose en respuesta a la selección genética realizada para mejorar la producción, debido a una correlación genética positiva entre producción y mastitis (Shook, 1985; Emanuelson, 1987; Syväjärvi et al, 1986).

La mastitis se ha definido clásicamente como una inflamación de la glándula mamaria, normalmente a causa de algún microorganismo, si bien se han descrito mastitis asepticas y subclínicas, sin evidencia de inflamación. Esta inflamación tiene una especial importancia por su impacto socio-económico, en la explotación del ganado vacuno lechero en régimen intensivo. Es un proceso ampliamente extendido (hasta un 10% del global de la cabaña bovina por término medio), de tal modo que raras veces una vaca cualquiera no experimenta un episodio de mastitis. Tanto la mastitis clínica como las formas subclínicas, más frecuentes que la primera, suponen anualmente cuantiosas pérdidas económicas (Bandinand, 1978).

Ya en 1978, Badinand formula la existencia de diversos factores a considerar en el estudio de la predisposición a la mastitis bovina (**intrínsecos**(morfología de la mama, producción lechera, edad, estadio de lactación, inmunidad, equilibrio hormonal) y **extrínsecos** (estación del año, desequilibrio en la alimentación, higiene de la explotación, tipo de manejo y ordeño) y **ocasionales** (retención de leche, cambios bruscos de alimentación, traumatismos del pezón y bajada de las temperaturas). Asimismo se tenía que considerar la **especificidad**, **patogenicidad** y **frecuencia** del germen asociado al proceso mamítico.

De acuerdo con la sintomatología, pueden diferenciarse 2 formas de mastitis: clínica y subclínica. Esta evoluciona sin signos inflamatorios externos, con aumento del SCC y presencia de microorganismos causales en la ubre. Son la forma predominante (de 20 a 50 veces más que las clínicas). Pueden convertirse en clínicas (agudas o crónicas) (en ello estriba su importancia). Una variedad de la mastitis subclínica es la alteración de la secreción (mastitis aséptica) cuya causa no es la infección por gérmenes, sino la influencia de factores ambientales.

Las mastitis clínicas presentan una sintomatología variada, desde variaciones discretas de la norma de calidad lechera hasta la desaparición completa de los caracteres propios de la leche, pérdida total de producción y trastornos graves del estado general. Es rara su curación espontánea. De acuerdo con el curso evolutivo de la enfermedad y el grado de sintomatología, pueden diferenciarse **mastitis clínicas subagudas, agudas y crónicas**. Las agudas evolucionan con acusados síntomas de inflamación, apreciándose en la ubre hinchazón, enrojecimiento, aumento de la temperatura basal, dolor a la palpación y endurecimiento de los tejidos mamarios. La leche, en pequeña cantidad, presenta alteraciones organolépticas visibles. Casi siempre la enfermedad da lugar a una lesión permanente de la ubre con pérdida definitiva

de la leche. Las crónicas son las inflamaciones de la ubre de larga evolución, sin alteración del estado general. El contenido de células somáticas siempre es alto y la producción láctea es variable.

Para controlar el estado sanitario de la ubre en la propia explotación, además de realizar la inspección visual y la exploración clínica, se pueden realizar los recuentos de células somáticas en un analizador, complementando los datos con el análisis bacteriológico de la leche tomada asepticamente de los cuarterones inflamados, o sospechosos cuando menos, de la ubre.

La mastitis tiene una serie de posibles efectos sobre la salud pública, la calidad higiénica de la leche y la tecnología lechera. Por ejemplo, las mastitis dan lugar a una importante modificación en la composición de la leche (la cantidad de extracto seco total disminuye y se modifica la relación entre los diversos constituyentes de la leche). La mayoría de los autores opina que la disminución del porcentaje de materia grasa está en función de la pérdida de producción láctea total. También influye la mastitis en el contenido de ácidos grasos libres, en el de fosfolípidos y en la composición de ácidos grasos (Randolph y Erwin, 1974). Ninguna de estas variaciones tiene utilidad para diagnosticar la infección. El contenido total proteico no sufre normalmente un cambio apreciable debido a la mastitis. La infección de la glándula mamaria provoca una reducción en el contenido de lactosa (hasta más de un 30% del valor normal) siendo ésta la principal causa de la disminución del contenido en extracto seco magro de la leche. La gran influencia de la infección sobre el contenido en lactosa facilita el que se utilice la determinación de este parámetro químico como indicador diagnóstico de una mastitis. El descenso en el contenido de lactosa se acompaña normalmente de un cambio en el equilibrio de minerales de la leche (Tolle, 1969). Los efectos más importantes son una

disminución en el potasio y un aumento en la concentración de sodio y cloruros, lo que se ha utilizado ampliamente como técnica de detección de una posible infección, bien determinando los valores absolutos de los tres parámetros, bien determinando y relacionando los niveles de cloruros y sodio o de cloruros y lactosa. También se ha utilizado la determinación única de cloruros, estableciendo un valor umbral para la confirmación de presencia de infección.

La calidad higiénica de la leche mamítica puede verse afectada en sus aspectos organoléptico y microbiano. En el caso de las mamitis crónicas, los recuentos microbianos totales de los cuarterones infectados en la ubre están por debajo de las 10.000 ufc/ml de leche en el 70% de los casos y por debajo de 50.000 ufc/ml en el 95% (Jorgensen, 1981). En el caso de las subclínicas, el n° varía de 210 a 78.000 ufc/ml o de 270 a 786.000 ufc/ml (Tolle, 1981) para los patógenos mamíticos de mayor importancia (*Streptococcus agalactiae* y *Staphylococcus aureus*).

Agentes etiológicos de la mamitis

La mamitis normalmente es consecuencia de una infección microbiana, con un amplio rango de gérmenes causales (Heidrich and Renk, 1967; Philipet and Pankeh, 1975; Schultz et al, 1978, Braml. / and Dodd, 1984) siendo los microorganismos más ampliamente detectados en la glándula mamaria y por ende en la leche los cocos Gram positivos catalasa positivo y negativo (estafilococos y estreptococos (Devriese, 1979; Watts, 1986), el coliforme *E. coli* y el hongo *Candida albicans*, constituyendo entre todos los responsables del 80 al 90% de las mamitis clínicas y subclínicas producidas en ganado bovino de alta producción lechera en régimen intensivo. Otros microorganismos responsables de mamitis con

significación estadística son *Corynebacterium bovis*, *C. pyogenes* (responsable principal de la llamada mamitis de verano), *Bacillus* spp, *Listeria monocytogenes*, *Enterobacter* spp, *Klebsiella pneumoniae* y *Serratia marcescens*.

Los estreptococos de significación en mamitis bovina son *Streptococcus agalactiae*, *S. dysgalactiae* y *S. uberis*, como patógenos principales, y *S. bovis*, *S. pyogenes* y *Enterococcus faecalis/faecium* como patógenos secundarios, cuya aparición está relacionada con factores ambientales y de manejo. La prevalencia e incidencia relativas de estos microorganismos varía con las características microclimáticas, orográficas y fundamentalmente las asociadas al sistema de producción de leche, ya que la mamitis es una enfermedad facilitada por el estrés inherente a la extracción intensiva de leche con el ordeño mecánico.

El estafilococo de mayor importancia clínica en mamitis es el *S. aureus*. Otros, coagulasa positivos o negativos, se han aislado repetidamente en casos de mamitis (*S. epidermidis*, *S. xylosus*, *S. warneri*, *S. intermedius*, ...) siendo los estafilococos coagulasa negativos los más implicados en la mamitis de vacas en primera lactación (Brown, 1973; Oliver and Mitchell, 1983).

Los patógenos secundarios se han asociado normalmente con una irritación leve de la ubre y una leucocitosis leve en la leche sin sintomatología clínica de infección mamítica. Los micrococcos y los estafilococos coagulasa negativos son los gérmenes más prevalentes asociados a la piel de la ubre, el canal galactóforo y el interior de la glándula mamaria (Schultz et al, 1978) inclusive en rebaños con problemas substanciales de patógenos principales (Edwards and Jones, 1966; Ward and Schultz, 1972). Aproximadamente el 25% de los aislados de la flora normal recogida de los extremos de los pezones en vacas sanas (como algunas especies del gno *Bacillus*, *Corynebacterium*, *Lactobacillus*, *Micrococcus*,

Staphylococcus, y diversas especies de coliformes) es inhibitoria *in vitro* de los patógenos mamíticos Gram positivos y Gram negativos principales o contagiosos (Woodward et al. 1987, 1988). La colonización de los pezones con la flora normal que inhibe a los patógenos *in vitro* puede incrementar así la resistencia a la mastitis.

Conceptos epidemiológicos básicos de la mastitis

Debido al elevado coste económico que genera al ganadero su aparición y a su importancia epidemiológica en el mantenimiento del estatus sanitario del ganado, se han venido desarrollando programas de control de mastitis y elaborado varios sistemas de diagnóstico. El método más común de diagnosticar la mastitis subclínica es el análisis bacteriológico en combinación con el recuento celular directo o indirecto; no obstante, este método es caro e inadecuado para un diagnóstico de rutina a gran escala. Cuando se evalúa la relación entre los recuentos celulares totales de la leche de la ubre y las mastitis subclínicas se ha de tener en cuenta que la salud de la ubre se define según los hallazgos microbiológicos y los recuentos celulares de los primeros chorros de leche de cada cuarterón estimados por diversas técnicas. La clasificación de los cuarterones está basada principalmente en un modelo causa-efecto (IDF, 1971) que se acepta generalmente, y que se basa en la asunción de que los gérmenes patógenos producen una reacción inflamatoria que se refleja en un elevado recuento celular. De este modo, el objetivo de la clasificación es una función de la aparición de gérmenes patógenos y su influencia en el recuento. De acuerdo con Neave (1975), debe realizarse un examen bacteriológico confirmativo a fin de minimizar las probabilidades de obtener falsos resultados.

De este modo, han de tenerse en cuenta, al interpretar la información relativa a la

mamitis subclínica, las limitaciones del modelo de diagnóstico:

- 1) Las contaminaciones de fuentes extramamarias y las infecciones del canal galactóforo pueden interferir con el diagnóstico bacteriológico (Forbes&Herbet, 1968; Neave, 1975).
- 2) La variación en la concentración de las bacterias en los cuarterones infectados puede conducir a interpretaciones erróneas (Neave, 1975; De Vries, 1986).
- 3) El grado de virulencia difiere inter e intraespecíficamente
- 4) Muchos gémenes pueden ocasionar mamitis.
- 5) La variación en el recuento celular está causada por las bacterias, así como por factores no bacterianos, y tener esto último en cuenta puede mejorar la interpretación de los datos.
- 6) El recuento celular refleja el grado de daño tisular o el nivel de la infección en una escala más o menos continua; introduciendo valores umbral del recuento celular se pierde la continuidad en el análisis de la evolución de tal infección.

El procedimiento más usual cuando se evalúa la relación entre el recuento de la ubre y la mamitis subclínica es dividir el material (la leche de la ubre) en dos categorías (positiva y negativa) sobre la base del diagnóstico del estado sanitario del cuarterón.

Así, las muestras negativas estarán por debajo de un umbral dado y las positivas por encima, lo que se considera como correctamente clasificado. El umbral está con frecuencia establecido en un nivel donde las proporciones de falsos positivos y/o negativos son despreciables.

La distribución de los recuentos de células somáticas dentro de un rebaño ayuda a la identificación de problemas específicos dentro del programa de control de mamitis de un rebaño (Doehoo y Morris, 1983).

El método más común para la detección a gran escala es monitorizar el SCC.

El efecto de incremento de SCC por la presencia de patógenos mamíticos se encuentra a todos los niveles de producción lechera, pero la amplitud de la variación en el incremento depende de varios factores intrínsecos o ambientales, afectando a vacas infectadas o sanas en un mismo rebaño.

Los SCC, así como los análisis bacteriológicos, en la primera leche de ordeño de cada cuarterón de la ubre, sirven como indicadores del estatus de salud de la ubre, de tal modo que la prevalencia de la mamitis subclínica se incrementa con la edad, así como la incidencia de la mamitis clínica (Norman & Van Vleck, 1972; Wilton et al, 1972). En el caso de examen de muestras repetitivas de los cuarterones la prevalencia es función de (según Dood & Neave, 1970): la incidencia, el QIR (en porcentaje), y de un factor de corrección de las variaciones en el nº de observaciones por lactación.

En la prevalencia de la IMI influyen significativamente la localización, el rebaño y la estación del año (Trinidad et al, 1990).

La frecuencia de IMI en las vacas se incrementa con la edad, con un pico de incidencia en la segunda (Erskine et al, 1988) o tercera lactaciones (Batra et al, 1977), sin una tendencia definitiva después de la cuarta lactación. En cuanto a la estación, la mayor incidencia de mamitis está asociada principalmente con gérmenes ambientales, en los meses de invierno y primavera.

La mamitis ambiental, en sentido amplio, es el conjunto de IMIs causadas por patógenos cuyo reservorio primario es el medio ambiente en el que vive la vaca y los cuarterones no infectados (Oz, 1985). En particular, el diagnóstico de las IMIs causadas por aquellos es difícil, con infecciones de corta duración, escasa concentración de UFC por ml de leche y sospecha de posible contaminación. Hay necesidad de conocer las características de los

patógenos ambientales y la dinámica de las infecciones que producen en los rebaños. Tal información puede derivar en el establecimiento de métodos más eficaces de control. Las IMIs se diagnostican en estos casos cuando: 1) se recoge el mismo patógeno de 2 o más muestras consecutivas de leche de los cuarterones infectados; 2) el mismo patógeno es recogido de 2 muestras de leche de cuarterón en 30 días y 3) se hace un aislamiento de un patógeno en un cuarterón con mastitis clínica. Cada patógeno se sigue como una IMI individual para el análisis de los datos (Para diagnosticar un cuarterón como afectado por mastitis clínica se valora un SCC de 10^6 cél/ml como mínimo. Se utilizan los resultados de los cultivos de las muestras para determinar el origen de las IMI).

El porcentaje de cuarterones infectado se determina retrospectivamente una vez se identifican todas las IMI y es función tanto del índice de IMI como de su duración. Este porcentaje se valora por día de lactación y día del año. Los resultados indican una tendencia estacional de la mastitis clínica. Los SCC de la leche de mezcla en tanque reflejan el modelo general de incidencia baja y alta de la mastitis clínica durante el año. La mayoría de los casos clínicos se asocian con el aislamiento de 2 grandes grupos de patógenos.

La mayoría de los estudios sobre la aparición de la mastitis en las vacas se enfocan sobre la presencia/ausencia sin considerar el n° de episodios (Dish et al, 1989; Erb et al, 1985; Gröhn et al, 1986). Se considera la incidencia a nivel rebaño.

Las técnicas epidemiológicas ofrecen importantes herramientas para estudiar los indicadores de riesgo de rebaño (Rothman, 1986). La identificación de estos indicadores en el rebaño contribuye a la formulación de la patogénesis de la mastitis clínica con bajos SCC en rebaño y se facilitan así las mejoras en los programas de control.

Para el diagnóstico de la mastitis clínica y/o subclínica, la vía principal ha sido siempre

el cultivo microbiológico de las muestras de leche (Eberhart et al, 1982; Mc Donald, 1989) para el aislamiento de los patógenos principales y/o secundarios (en varios estudios del diagnóstico de la mastitis clínica, entre el 12 y el 38% de las muestras de vacas con mastitis tuvieron cultivos negativos al utilizar el método estándar de cultivo (Anderson et al, 1982; Daniel et al, 1982; Hill, 1986; Pearson y McKie, 1979). Para mejorar el índice de cultivo positivo de muestras de leche con una baja concentración de bacterias, se han sugerido volúmenes mayores de inoculación en placa e inoculación de la muestra (Brown et al, 1981) (González et al, 1987, 1989 y 1990).

Se utilizaron técnicas de cultivo de eficacia "aumentada" para incrementar la recogida o detectar la presencia de patógenos en leche de casos con mastitis clínica (Dinsmore et al, 1992). Los resultados de las muestras consecutivas potencian la probabilidad de un diagnóstico adecuado y pueden usarse para generar estándares para comparación de métodos de análisis. No obstante, la economía y la practicidad recomiendan que se use una sola muestra en investigaciones de campo de la mastitis.

Técnicas de detección de IMIs productoras de mastitis.

Los métodos y técnicas desarrollados para diagnóstico están basados en la consideración de las siguientes características de los patógenos principales:

- 1) Son capaces de ser fácil y repetitivamente cultivados esos gérmenes de 0.01 ml de leche sembrada en agar sangre con o sin esculina.
- 2) No son resultado de la contaminación de una muestra de leche.
- 3) Producen IMIs de larga duración en ausencia de antibioterapia.

Tales características no se cumplen con los patógenos ambientales y su diagnóstico es más difícil, porque las IMI son de corta duración. Las ufc/ml de leche en cuarterones

infectados son frecuentemente menores de 100. El aislamiento de estos gérmenes en un cultivo de leche podría ser resultado de la contaminación de la muestra.

El papel del cultivo bacteriano es primordial, incluso en rebaños en los que los signos clínicos y los perfiles de SCC sugieren una improbabilidad de mastitis.

La mayoría de los rebaños se clasifican, a efectos epidemiológicos, en 4 categorías (Sischo et al, 1993): 1) libre de patógenos principales; 2) presencia de estafilococos coagulasa positivos pero no *S. agalactiae* aislado de al menos 1 muestra de leche); 3) presencia de *S. agalactiae* pero no de *S. aureus*, aislado de al menos 1 muestra y 4) aislados *S. agalactiae* y *S. aureus* en una muestra al menos. El n° de rebaños con el supuesto 4 es bajo, por lo tanto, estos rebaños se agrupan con aquellos donde se aísla solo *S. agalactiae* para la evaluación de prácticas de control de mastitis relacionadas con el estatus de patógenos del rebaño.

La sensibilidad y especificidad de detección de *S. agalactiae* y *S. aureus* depende del método por el que se establece el diagnóstico definitivo (Sears et al, 1991) (Postle, 1968, Goodkin et al, 1990) (ya que el uso de la leche de tanque para detectar la presencia de los patógenos primarios no es un test perfecto).

Los esquemas de control de *S. aureus* y *S. agalactiae* se plantearon después del desarrollo de los métodos de identificación eficaz y estudios epidemiológicos definitivos (Bramley and Dodd, 1984; Dodd, 1986). El control de los otros estreptococos ha sido más difícil debido a su amplia distribución. Cambios recientes (Collins et al, 1983, 1984; Devriese et al, 1980; Dodd, 1986; Farrow et al, 1983, 1984) en la taxonomía de la familia *Streptococcaceae* permitieron el desarrollo de sistemas de identificación mejorados, mediante el uso de técnicas de hibridación de ADN y de pruebas de oligonucleótidos.

El aislamiento para su identificación de los enterococos es muy variable en su

proporción de unos estudios a otros. La diferencia en el índice de aislamiento puede deberse a diferencias en la muestra de la población, descripción de nuevas especies, disponibilidad de más tests de diagnóstico, etc.... Las técnicas de cultivo "mejoradas" (incubación de precultivo, aumento del volumen de inóculo y congelación del precultivo) incrementan significativamente la sensibilidad del cultivo respecto al método estándar (inoculación de placas de agar-sangre con 6.01 ml de leche e incubar a 37°C durante 24-48 horas) (Dinsmore et al, 1990, 1991) ya que varios estudios del diagnóstico microbiológico de mastitis clínica citaban porcentajes de entre el 12 y el 38 por ciento en muestras de leche de vacas mamíticas que daban cultivos negativos con el método estándar (Anderson et al, 1982; Daniel et al, 1982; Hill, 1986; Pearson y Mckie, 1979). El método aumentado/mejorado que producía un incremento de la sensibilidad sin aumento significativo del índice de contaminación era la siembra de 0.1 ml de leche incubada a 4 horas.

Se utiliza el test de la chi-cuadrado de McNemar para conocer que especie bacteriana incrementa su sensibilidad de aislamiento (se verifica que son los coliformes y los estreptococos ambientales (Dinsmore et al, 1990)).

Varios investigadores han señalado volúmenes relativamente grandes de casos clínicos de mastitis bovina en las cuales no pudo demostrarse un agente etiológico en el cultivo (Pearson y Mckie, 1979; Daniel y otros, 1982).

Los métodos recomendados para la identificación de *S. aureus* y *S. agalactiae*, como patógenos mamíticos principales, aislados en IMIs bovinas, enfatizan el empleo del test de la coagulasa y el test de CAMP (Brown et al, 1981; Pedersen et al, 1981).

Para los estafilococos coagulasa positivos (*S. aureus*, *S. hyicus* y *S. intermedius*) productores de mamitis bovina (Langlois et al, 1983) (Watts et al, 1983) la utilización única del sistema API STAPH no mostraría un 100% de eficacia en identificar tales cepas. El crecimiento en agar P suplementado y el resultado del test de la B-galactosidasa permitirían una fácil diferenciación de los tres estafilococos (Roberson et al, 1992), con un 100% de eficacia.

El National Mastitis Council, en 1990, recomendó utilizar el test de la acetoina (o Vogts-Proskauer, VP) como medio adicional para diferenciar *S. aureus*. El Subcomité de Taxonomía de Estafilococos y Micrococos, en 1965, también recomendaba usar la fermentación anaeróbica del manitol para diferenciar *S. aureus* de los otros estafilococos coagulasa positivos.

Además de las técnicas miniaturizadas bioquímicas (API STAPH, API 20 STREP), existen sistemas de diagnóstico rápido para identificación de los patógenos mamíticos de mayor prevalencia/incidencia. Pueden ser métodos serológicos (como el de coagulación en látex en porta) y enzimáticos (como los enzimo-inmunoensayo, que pueden estar ligados a un componente cromogénico que actúa de sustrato para la reacción enzimática (ELISA) y que tiene diversas variantes: captura, sandwich, competición,...

Los tests de aglutinación en látex para la identificación de *S. aureus* y *S. agalactiae* son ya ampliamente aceptados y utilizados en laboratorios clínicos con aislados de humanos. En 1988, se utilizó el RAPID MASTITIS TEST (RMT) (un sistema de aglutinación en látex para la identificación de *S. aureus* y *S. agalactiae* en aislados bovinos (Watts and Owens, 1988). El RMT es útil para hacer un screening de grandes volúmenes de aislados de *S.*

aureus (Watts and Owens, 1988); no obstante, los volúmenes pequeños requieren el test de la coagulasa para la detección de ciertas características claves. El RMT no es tan eficaz como el test de la coagulasa EN 24 HORAS, pero es comparable en sensibilidad al test del factor cumpling y el de la coagulasa en 4 horas, combinados.

Además, el RMT está diseñado específicamente para su uso en bacteriología mamaria.

En 1984, los ensayos que ya se realizaban de aglutinación específica de las cepas de *S. agalactiae* de origen IMIs bovinas indicaban una posible relación entre la capacidad de esas cepas para aglutinarse en presencia de leche bovina (Wanger and Dunny, 1984) y su capacidad para adherirse a las células de la glándula mamaria, ya que es un parásito intramamario obligado (Mc Donald, 1977), lo que podría influir en la determinación de su rol ecológico en la glándula bovina y en que medida el fenómeno de adherencia influye en la patogenicidad de *S. agalactiae* para la ubre.

En 1986 se ensayó un test de aglutinación en látex para la detección de antígenos de *S. agalactiae* de IMIs bovinas (Daniel and Barnum, 1986). Todas las muestras conteniendo *S. agalactiae* fueron positivas a este test bien antes o bien después de 18 horas, incubando a 37°C. Los resultados obtenidos sugieren que donde un cuarterón llega a ser infectado con *S. agalactiae* el test de aglutinación se hará positivo en 24 horas, y en los casos donde se desarrolle mamitis clínica puede permanecer positivo 1 a 3 días después de que el organismo haya desaparecido de la secreción láctea. El test de látex podría jugar un cierto papel en detectar vacas infectadas y rebaños testando los sueros de muestras de leche de tanque de mezcla, ya que tales muestras pueden contener muchos contaminantes que hagan la interpretación difícil.

Ya en 1993 se aplicaron las técnicas ELISA para la detección de antígenos bacterianos en secreciones lácteas con cultivos negativos, con lo que se podía demostrar la presencia del microorganismo productor de la IMI en un momento determinado del curso de la mastitis (Zorah, 1993). La técnica usada se basó en la doble técnica sandwich descrita por Voller et al (1980).

Otros desarrollaron un ELISA diseñado para detectar anticuerpos frente a *S. aureus* (Adams et al, 1990). Otras investigaciones han mostrado una pobre correlación entre los resultados del ELISA y el cultivo microbiológico de las muestras (Hicks, CR et al, 1990). Se sugirió combinar los resultados del ELISA en muestras consecutivas con la determinación del SCC para mejorar la sensibilidad y la especificidad (Costello et al, 1990).

Se compararon el cultivo microbiológico, el ELISA y la determinación del SCC realizada en muestras de leche como métodos para identificar las vacas con IMI por *S. aureus* (Hicks et al, 1994). El uso de cultivo repetidos podía mejorar la eficacia del diagnóstico de la mastitis por patógenos ambientales.

Se calcularon la sensibilidad, especificidad y ratio de probabilidad también para realizar el ELISA en muestras consecutivas, y determinar la SCC en esas muestras y combinar los resultados del ELISA con los SCC (Hicks et al, 1994).

Los datos de las vacas se incluían solo si estaban disponibles los resultados del ELISA y del cultivo microbiológico obtenidos en 3 muestras consecutivas. Las vacas se consideraron positivas a IMI por *S. aureus* si los resultados del cultivo eran positivos en 2 de 3 muestras consecutivas primeras recogidas de cada vaca.

La sensibilidad se calculaba como el n° de vacas con un resultado del test positivo dividido por el n° de vacas con IMI. La especificidad se calculaba como el n° de vacas con un resultado de test negativo dividido por el n° de vacas que no tuvieron IMI. El ratio de probabilidad para un test positivo se calculaba como la relación entre sensibilidad y 1-especificidad, y para un test negativo como 1-sensibilidad respecto a especificidad (Sackett et al, 1991).

La repetibilidad de los resultados del ELISA y el cultivo microbiológico se determinó calculando el porcentaje de vacas que tuvieron resultados de test consistentes para dos y para tres muestras consecutivas. La prevalencia se calculó sobre la base del cultivo microbiológico de las primeras muestras recogidas de vacas de las cuales nunca se aisló *S. aureus*. Se calculó también el ratio de prevalencia de densidades ópticas (Rothman, 1986) para determinar el riesgo de un resultado positivo por ELISA para vacas con IMI por *S. agalactiae*, estafilococos coagulasa negativos, coliformes o *C. bovis*.

Los resultados del ELISA coinciden con el estatus de IMI más frecuente en vacas con elevados SCC, pero la inclusión de vacas con bajos SCC no justificaba el pobre rendimiento del ELISA. Los resultados del estudio de Hicks et al (1994) indicaban que el cultivo microbiológico todavía es el mejor método para identificar casos individualizados de vacas con IMI por patógenos mamáticos principales (*S. aureus*, *S. agalactiae*, *S. dysgalactiae*,...).

Las decisiones para usar un método de diagnóstico u otro debían incluir una evaluación de la cantidad y tipo de información obtenida de los resultados de cada test. El ELISA tenía un blanco específico, normalmente un solo patógeno, y sus resultados no proporcionaban información sobre otros patógenos potenciales. El cultivo microbiológico

constituía un test relativamente inespecífico que proporcionaba información sobre una amplia variedad de patógenos susceptibles de producir IMI.

Una alternativa al método ELISA antecitado se desarrolló mediante una técnica para detectar anticuerpos específicos que se fijasen a una fracción antigénica purificada de *S. aureus*. El test tuvo una eficacia del 77% de detección cuando se comparó con los métodos de cultivo bacteriano. Tuvo una sensibilidad del 92% para cultivos positivos y una especificidad del 100% para los negativos (Grove and Jones, 1992) (ELISA PROSTAPH).

Los experimentos se diseñaron para comparar el test ELISA PROSTAPH con los métodos convencionales para la identificación correcta de vacas con IMI por *S. aureus* y para evaluar la eficacia de las medidas de higiene en el ordeño, que podrían devenir en la prevención de nuevas IMIs, determinar la utilidad de hacer un screening de los rebaños para identificar vacas con infección por *S. aureus* y usar esa información para implementar prácticas de manejo que ayuden a prevenir la dispersión de IMI, determinar la prevalencia de las IMI con más rebaños y definir la relación entre los anticuerpos frente a *S. aureus* en la leche cruda de tanque y la prevalencia de IMI por *S. aureus*.

Partiendo de la premisa de que algunos investigadores han señalado que la medición del nº de PMN en la leche mamílica proporciona un indicador específico del nivel de inflamación y la infección (Cullen, 1966; Ruffo, 1968; Schalm et al, 1971), se diseñó un test ELISA que detectase ese tipo celular específicamente para detectar la mastitis subclínica con prontitud (O' Sullivan et al, 1992). El ELISA, de tipo sandwich de captura, se usó para testar la presencia de recuentos de PMN elevados en muestras de leche recolectadas semanalmente durante un período de 5 semanas en un ensayo y en muestras obtenidas de vaca directamente en un 2º ensayo. La sensibilidad, especificidad y eficacia se calcularon de acuerdo con lo

expuesto por Hart en 1980. En los resultados no hubo diferencia significativa entre las SCC predichos y los reales, indicando que las absorbancias obtenidas usando el ELISA de captura se correlacionaron muy bien con el SCC. Estos resultados muestran que el ensayo es capaz de medir al menos concentraciones celulares tan bajas como 100.000 cél/ml.

Es evidente que el ELISA de captura se correlaciona mejor con el SCC que con cualquier otro test, incluyendo las medidas de NAGasa, sodio, conductividad eléctrica, BSA, actividad de la esterasa y de otras enzimas.

Los resultados muestran que las absorbancias obtenidas en el ELISA pueden usarse cuantitativamente para determinar si una muestra de leche es mamítica o normal, y también para predecir adecuadamente una muestra con un SCC de umbral tan bajo como 100.000 cél/ml. Así, el ELISA de captura detectará la inflamación causada por todos los patógenos que excitan la migración de los PMN. El ELISA específico frente a PMN tiene un potencial significativo como tal test de uso simple para chequear vacas o cuarterones con mamitis subclínica, ayudar a prevenir la mamitis clínica, la dispersión de la infección por aislamiento de las vacas infectadas con mamitis, identificar los cuarterones de la ubre individualizados con problemas y seleccionar y eliminar leche mamítica del tanque, así como mantener el SCC del tanque bajo y la calidad de la leche ahí. El test podría usarse también para monitorizar la eficacia de los tratamientos antibióticos.

Las técnicas de diagnóstico de la mamitis más avanzadas se basan en la biología molecular y el uso de hibridación de ADN y sondas de ácidos nucleicos para la detección de microorganismos. Esto comenzó en los años 80, y su principio de trabajo se basa en la detección cualitativa de secuencias de ADN bacteriano típico y por lo tanto ofrece la ventaja de su alta especificidad, manejo simple y seguridad mejorada durante el protocolo de testaje

(Johnson, 1989; Mazola et al, 1991; Notermans, 1990).

Se han presentado estudios relacionados principalmente en la detección de *E. coli*, *Salmonella*, *Shigella*, *S. aureus* enterotoxigénico y *Listeria*. En 1992, se adaptaron 2 pruebas de ADN comerciales (GENETRAK E.COLI Y GENETRAK S.AUREUS TEST) para la detección de esos patógenos en leche de vaca. Principalmente se volcaron en la aplicación del Genetrak *Staph. aureus* test para la detección de ese patógeno en leche mamética (Kneifel et al, 1992).

Todas las cepas de enterobacteriaceas obtenidas del análisis microbiológico en su estudio fueron examinadas usando el Genetrak *E. coli* test. Basado en el límite de absorción dado de 0.1 unidades, la detección de *E. coli* fue posible a recuentos viables de $0.5 \cdot 10^5$ hasta $4 \cdot 10^7$ ufc/ml.

Los estafilococos obtenidos fueron testados con el Genetrak *S. aureus* test. Se observó una especificidad del 100% con todas las cepas de *S. aureus*, significando la ausencia de falsos positivos y/o negativos. Para dar valores de absorción iguales o menores de 0.1 fueron suficientes recuentos de 10^4 y 10^5 ufc/ml. Debido a esa alta sensibilidad, se ensayó la simplificación de la preparación de la muestra de leche para permitir una detección más rápida de *S. aureus* en leche mamética de los cuarterones de la ubre. Se demostró que ya menos de 10^5 ufc/ml daban una reacción coloreada positiva indicando que la sensibilidad estaba en el mismo rango. Adicionalmente, se verificó que las otras bacterias maméticas tales como *S. agalactiae*, *S. dysgalactiae* y *S. uberis* no interferían con la prueba del ADN.

En esencia, las pruebas de ADN siguieron el principio de hibridación de ADN basada

en una reacción específica entre las pruebas de ADN de oligonucleótidos sintéticos y el ARNr de las bacterias (Mozola et al, 1991). La sensibilidad correspondiente dependía en gran medida del volumen de ARNr producido durante la multiplicación de las células bacterianas y una absorción óptica de fondo causada por las matrices de la muestra (Pearson, 1988). La sensibilidad de este tipo de pruebas se ha considerado comúnmente una desventaja, ya que descubrimientos recientes con los sistemas basados en la PCR han mostrado límites de detección significativamente menores (Chandrian et al, 1991; Hill et al, 1987; Notermans, 1990).

La especificidad puede ser vista como una gran ventaja de las pruebas de ADN (Hsu et al, 1991; Mozola et al, 1991).

La experiencia ha mostrado que hay necesidad de métodos fiables para la detección específica de *S. aureus* como patógeno en mastitis subclínica. De acuerdo con los hallazgos de Kneifel et al (1992) la prueba de ADN Genetrak *S. aureus* test puede aplicarse con éxito para evaluar la situación epidemiológica de los rebaños, ya que incluso pueden detectarse recuentos de *S. aureus* menores de 100 ufc/ml en unas 30 horas, abarcando así manifestaciones subclínicas de la mastitis. Modificando el protocolo inicial del test podría reducirse el tiempo de detección de volúmenes relativamente importantes de bacterias viables que produzcan síntomas de mastitis hasta las 6 horas por lo que serían de gran interés para el screening de mastitis en los rebaños.

En 1993 se describió el desarrollo de pruebas de hibridación de oligonucleótidos, derivados de secuencias características dentro del gen que contiene la subunidad 16S del *RII*Ar, para la identificación específica de los diversos tipos de *S. uberis* (Harland et al, 1993) (causante de gran cantidad de mastitis bovinas hoy en día (aproximadamente 8 de cada

100 casos de mastitis clínica por año en vacas (Hillerton et al, 1992)). El método usado, basado en la amplificación por PCR de una parte del gen de la subunidad 23S del ARNr seguido de hibridación con pruebas de oligonucleótidos específicos, proporcionó un método inequívoco de diferenciación de biovars dentro de la especie *S. uberis* y de esa especie respecto a otros estreptococos mamicos, lo que facilita la investigación epidemiológica de estas especies, en especial el papel preciso jugado por *S. uberis* en la mastitis bovina.

Se ha utilizado un método de PCR basado en el mapa de ADN para identificar especies de estreptococos y enterococos aislados de leche bovina (Jayarao and Oliver, 1994). El examen de los modelos de secuencias de ADN reveló que cada especie evaluada poseía un único perfil de secuenciación. Se desarrolló un esquema sencillo de identificación basado en la aparición de fragmentos primarios y secundarios de ADN para cada especie. El ensayo de PCR fue simple de realizar, fiable y reproducible. Concluían que los patógenos de mastitis pueden identificarse usando este método, y la técnica tiene el potencial de constituir una alternativa a la caracterización fenotípica en la identificación de los patógenos mamicos.

OTROS METODOS DE DIAGNOSTICO DE MAMITIS relacionados con el control microbiológico de la flora de la leche aprovechan el rápido avance en automatización en los laboratorios de la industria láctea. Así tenemos el método de recuento PI, técnica HGME, técnica del Petrifilm, técnica de filtro epifluorescente directo (DEFT), métodos basados en la cuantificación del ATP bacteriano, y test de lisado amebocito de limulus.

OTRO DE LOS SISTEMAS DIAGNOSTICOS UNIVERSALES para la detección de mastitis es el SCC. Es una prueba que se realiza sobre las muestras de leche en tanque de mezcla o directamente de los cuarterones de la ubre. Este test se basa en el hecho de que la concentración de células en leche se eleva marcadamente al comienzo de la enfermedad,

particularmente en la fase inflamatoria, debido al paso de PMN de la sangre a la leche. pudiendo alcanzarse valores de varios millones de células por ml. de leche (Natzke et al, 1972). Según Miller y Schutze (1981), el SCC individual por vaca (en los cuarterones de la ubre) está influido por el **manejo del rebaño, el estado fisiológico, así como por el tipo de microorganismos que produce la infección**, pudiendo incluso observarse variaciones en los niveles normales de SCC entre vacas no infectadas. Por otro lado, se observó que el SCC está influido por **la estación del año, el estadio de lactación y la edad del animal**. En 1989 otros investigadores han obtenido conclusiones similares, explicando factores de corrección respecto del n° de partos y estadio de lactación para comparar valores de SCC individuales y facilitar la interpretación de los mismos como diagnóstico de la mastitis (Vecht et al, 1989). Se consideran también como factores de inversión, **la producción lechera diaria, la hora de la toma de muestra y la raza del animal (Brølund, 1985)** Así pues, el valor crítico de SCC es difícil de estimar. El solapamiento de las distribuciones del logaritmo decimal de SCC de las vacas infectadas no permite establecer un umbral de discriminación estadísticamente seguro (Andrews et al, 1983) No obstante, han definido el umbral límite de 250.000 cél/ml como **indicativo de animales no infectados**. Se consideran normales los SCC con menos de 300.000 cél/ml, con un 10-12% de neutrófilos, mientras que se catalogan como mastíticos SCC con más de 500.000 cél/ml y más de un 20% de neutrófilos (Tola y Cabeli, 1985). Resultados similares han sido obtenidos por Mielke (1989). Por otro lado, el uso del SCC como método de diagnóstico presenta problemas adicionales de interpretación (trabajos realizados por Schalm et al, 1971 y 1976; Poultriel et Lerondelle, 1978). Tomando como estándar el recuento de leucitos, el CMT es el más efectivo de los métodos indirectos (Karoiey and Dholakia, 1984).

Para realizar el SCC de forma automatizada, se emplea el Coulter y el Fossomatic. En ambos casos, es necesario, una vez calibrado inicialmente el aparato, controlar sistemática y periódicamente la exactitud de los resultados obtenidos por medio de su comparación con el recuento microscópico directo o mejor mediante estándares de leche con SCC conocidos.

El método Coulter funciona como sigue: las células somáticas son consideradas partículas que pueden contarse con un contador electrónico después de haber establecido un nivel umbral inferior y haberse eliminado el solapamiento de las partículas de grasa del mismo rango de tamaños que las células. Solamente se cuentan aquellos impulsos por encima del nivel umbral. Se permite la lectura directa del n° de SCC en miles de células por ml de leche. Se requiere una preparación previa de las muestras de leche, que se realiza fijando las células somáticas antes de la incubación con el reactivo Somaton. La capacidad del recuento es de hasta 210 muestras por hora (Magariños et al, 1984).

La relación entre SCC en leche de tanque de mezcla (BTSCC) y la situación real de mastitis en un rebaño lechero es bastante pobre, especialmente en grandes rebaños (Jaartveld et al, 1983). La introducción de los equipos automatizados de SCC ha aumentado la importancia del BTSCC como indicador de mastitis. También tiene otros usos: como medir el aspecto de la calidad de la leche y analizar los modelos de mastitis dentro del rebaño. Los modelos de mastitis en un rebaño pueden analizarse **monitorizando los cambios en el SCC de la leche de mezcla por el estadio y n° de lactación.**

Es un hecho bien establecido que el SCC varía entre fracciones (De Vries, 1976; Sysstad & Ron, 1981a). La leche total de la ubre refleja una mezcla proporcional de la leche total de las 24 horas de los diferentes cuarterones. Las muestras de la primera leche del cuarterón reflejan el SCC de la fracción de leche total producida desde el último ordeño.

La variación celular está afectada por causas bacterianas o ambientales (Brolund, 1985). Cuando se utilizan los SCC de UTM para la monitorización regular del estatus sanitario de la ubre, es necesario el conocimiento de estas causas para la correcta interpretación de los datos de SCC.

La información relativa a la presencia de bacterias patógenas y el SCC se usa como diagnóstico de la mastitis subclínica sobre una base o referencia del cuarterón. Son recomendados valores umbral de 500.000 células/ml por la IDF (Federación Internacional de Lechería). Los valores umbral facilitan el análisis interpretativo.

Existe la necesidad de hacer depender los umbrales elegidos para el SCC del estatus sanitario de la población (Poutrel & Rainard, 1982; Sheldrake et al, 1983a). La variación sana en los SCC estaría así clasificada sobre la base de los datos bacteriológicos y no se relacionaría con la función de la glándula mamaria.

Las SCC individualizadas por vaca mensuales no identifican correctamente infecciones clínicas de corta duración (Serieys, 1985).

En 1984 se determinaron el BTSCC por el método del viscosímetro y el recuento celular microscópico directo (Magariños et al, 1984). Sus resultados indicaron que el SCC medio se reducía claramente con la disminución de la temperatura, particularmente después de tener la muestra 48 horas a 4°C.

El SCC en una muestra de leche cruda fresca o refrigerada dada, depende en gran medida del estado inmunitario de la ubre de la vaca.

Existen una serie de mecanismos pasivos de defensa de la ubre frente a la infección (Paape et al, 1985) (Hamozi, 1980; Janicki and Balkiewicz, 1980; Madsen et al, 1987).

El mecanismo activo más importante de defensa contra la infección y por ende la mastitis por parte de la vaca es la fagocitosis de los patógenos mediada por PMN y macrófagos (Poutrel, 1983; Craven and Williams, 1985; Rainard et al, 1988), siendo los macrófagos los más abundantes en leche, y por lo tanto en el SCC, de vacas sanas, y los PMN en la leche de las vacas mastíticas.

Se han realizado numerosos ensayos para aumentar el n° de células fagocitarias en la ubre (inmunoestimulación) (Craven and Hill, 1986; Huston and Heald, 1983; Kerhli et al, 1989; Nickerson et al, 1988; Owens and Nickerson, 1989b; Paape et al, 1988). Se han utilizado también vacunas inespecíficas que contienen patógenos secundarios para prevenir las IMIs ocasionados por patógenos principales (Owens and Nickerson, 1989a; Woodward et al, 1988).

La comprensión de los mecanismos de defensa específica de la ubre que están basados en factores humorales y celulares se ha incrementado marcadamente en los últimos años (Colditz and Watson, 1985; Craven and Williams, 1985; Lohuis et al, 1990; Park et al, 1992; Persson et al, 1992; Rainard and Boulard, 1992).

El examen de la actividad funcional de los PMN, el tipo predominante, ha mostrado que su actividad fagocítica y bactericida disminuye a lo largo del periodo seco y el previo al parto y durante la infección, así como se produce una reacción concomitante en la respuesta proliferativa de linfocitos T a los activadores policlonales y los patógenos durante estos periodos. Los mecanismos que miden la disminución de la actividad funcional de los leucocitos en las secreciones mamarias y la relación con el aumento de la susceptibilidad a las IMI todavía se desconoce. Los resultados de algunos estudios muestran que los linfocitos T activados estarán presentes en todos los estadios del ciclo de lactación de la vaca en la leche y

representan una elevada proporción de los linfocitos totales cuando se incrementa la incidencia de la infección, lo que podría juzgarse como que desempeñan un papel significativo en la regulación de la respuesta inmune a los patógenos en la glándula mamaria (Park et al, 1992).

En cuanto a los PMN, la efectividad de su acción inmunitaria depende de la prontitud y magnitud de la respuesta migratoria y su actividad fagocítica y bactericida (Craven and Williams, 1985; Hill, 1981; Hill et al, 1984; Paape et al, 1979). La importancia de la rápida migración de los PMN en el lumen de la glándula mamaria para la eliminación de la infección ha sido establecida.

En relación con el papel de la respuesta inmune humoral, se cita la función de las Igs, la lactoferrina y los factores del complemento en el proceso inflamatorio derivado de una IMI, con propiedades antibacterianas (por opsonización y neutralización) (Persson et al, 1992; Rainard, 1986; Rainard et Boulard, 1992), así como inducen quimiotaxis de los PMN y promueven la fagocitosis (Banks and Trauter, 1985; Chew et al, 1991; Norcross, 1991). Se ha podido medir la actividad fagocítica de los PMN frente a patógenos tales como *S. aureus*, por medio de un ensayo de fluorocromo (Anderson et al, 1992) o microscopia de fluorescencia (Fox et al, 1987).

OTRAS TECNICAS DE DIAGNOSTICO DE LA MAMITIS ya citadas en la literatura son la medición de la concentración de lactosa (Renner, 1980), el incremento de la concentración de cloruros (Sender, 1989), el estudio de la conductividad eléctrica de la leche (Feher y Takatsy, 1989), la concentración de enzimas lácticos tales como catalasa (Sharabi et al, 1986), NAGasa (Kaartinen and Jensen, 1988), fosfatasa, lactatodeshidrogenasa, ... (Kitchen et al, 1981; Sjaunja and Funke, 1989; Ball et al, 1989; Mattila and Frost, 1989; Connor and Eckersall, 1986). No obstante, conviene tener

en cuenta que en este tipo de criterios indicadores de mastitis los niveles enzimáticos pueden cambiar en la glándula mamaria en función del estado del animal y que algunas de estas proteínas ejercen un efecto indirecto sobre el nivel de la infección (Smith and Schaubacher, 1979; Saifi et al, 1977; Korhonen, 1980; Craven and Williams, 1985; Nickerson, 1985). Se propuso el estudio del nivel de NAGasa por cuarterón como ensayo para el estudio de la inflamación mamaria post-terapéutica con antibióticos (Pyorala, 1988).

Ante los problemas de interpretación que presentaban esos diagnósticos, la IDF recomendó utilizar habitualmente para la detección de mastitis subclínica una combinación de métodos bacteriológicos y una prueba para revelar la respuesta inflamatoria. Los indicadores de mastitis indirectos más comúnmente usados son la medición de la conductividad eléctrica y la de la concentración de NAGasa.

El valor predictivo de un test positivo de conductividad eléctrica permanece bajo en un nivel de baja prevalencia en la población (rebaño), con una sensibilidad global del 66% y una especificidad, también global del 94% (Nielen et al, 1992). Las medidas de conductividad eléctrica on-line se han introducido recientemente (Maatje et al (1992), con el objetivo de ayudar a monitorizar la salud de la ubre en un rebaño lechero. La conductividad típica de la leche normal está entre 4 y 5.5 miliSiemens/cm a 25°C y la distribución de las medidas es normalmente logarítmica. Está determinada por las concentraciones de aniones (principalmente cloruros) y cationes (sodio y potasio principalmente). Las concentraciones de ión potasio (K^+) disminuyen y se incrementan las de ión cloruro (Cl^-) e ión sodio (Na^+) en la mastitis. La concentración de iones en la leche mamaria cambia debido al incremento en la permeabilidad de los capilares sanguíneos, la destrucción de las válvulas de control de flujo y de los sistemas de transporte activo de iones. La concentración alterada de sodio, potasio y cloruros produce

el incremento de la conductividad sin cambios en la presión osmótica. Para distinguir entre leche normal y mamítica usando la conductividad eléctrica, se han investigado varios métodos. Se utiliza el índice entre cuarterones de la ubre (IQR) para marcar las diferencias de conductividad entre cuarterones y que podría señalar la existencia de mamitis en un cuarterón en particular. Se han propuesto variaciones en el IQR y una redefinición para mejorar los análisis estadísticos del mismo; además del IQR se han usado umbrales para valorar la diferencia entre el cuarterón con valor más elevado y con más bajo. Parece que la combinación del valor absoluto y el IQR, sin usar umbrales, con el tratamiento estadístico de un análisis de regresión logística proporciona el mejor modelo.

En general, los informes sobre la utilidad de la conductividad para detectar mamitis ofrecen resultados contradictorios. Una de las grandes diferencias obtenidas en esos estudios era la definición de vacas sanas y enfermas (estándar ideal) que se usaba en la investigación de la conductividad. La baja sensibilidad de este criterio de diagnóstico de la mamitis podría estar causada por el uso de un estándar ideal "incorrecto" más que por el uso de la conductividad en sí para detectar positivos a mamitis. La conductividad será mejor para detectar negativos que el estándar ideal.

La definición de este estándar (y que incluye SCC, CMT, cultivo bacteriológico, solos o en combinación; análisis de la sintomatología clínica y/o conductividad y concentración de lactosa en leche) para la mamitis subclínica no representa un estándar perfecto, debido a que se recomiendan medidas repetidas y combinación de tests. Quizá deba incluir también la producción láctea que se ve afectada por la mamitis. Debido a que la conductividad está relacionada con el daño al epitelio corporal, esto podría proporcionar una definición más eficaz de mamitis subclínica. Se ha encontrado que la pérdida de producción está

correlacionada con la conductividad.

El uso de la conductividad como un sistema de investigación o diagnóstico dependerá no solo de la sensibilidad y la especificidad sino también de la prevalencia de mamitis.

Una ventaja de los sistemas on line es que es posible una investigación para averiguar la ausencia/presencia de mamitis subclínica después de cada ordeño. Los sistemas on line podrían alcanzar una alta sensibilidad para mamitis subclínica o usarse para la detección precoz de la mamitis clínica, dependiendo de la secuencia de hechos en mamitis. Cuando se use la conductividad como primer test de selección, podrían usarse otros datos del sistema on line subsiguientemente para encontrar vacas anormales en la población positiva según la conductividad.

Algunos investigadores evaluaron la comparación intercuarterón de diversos indicadores de mamitis subclínica, abarcando la NAGasa y la conductividad entre otras (Jensen and Knudsen, 1991). Ellos observaron que los diagnósticos de mamitis basados en las muestras de leche de cuarterón recogidas cada vez estarán influidas solo levemente por la variación biológica al azar, y que las mismas diferencias relativas que existen en los niveles de los indicadores entre los 4 cuarterones de una vaca se revelarán independientemente del día de muestreo. Las correlaciones de los cocientes entre los indicadores reflejan con más precisión las relaciones reales intercuarterón de diagnóstico de los diversos indicadores.

La presencia de NAGasa en leche de vaca ha recibido una particular atención debido a la íntima relación entre la actividad de esa enzima en leche y el SCC en esa misma leche durante la lactación (Kitchen et al, 1980; Kaartinen and Jensen, 1988). La actividad de la NAGasa de las secreciones mamarias se incrementa durante la IMI (Kitchen et al, 1980) y durante la involución mamaria (Timms&Schultz, 1985) y declina rápidamente después del

parto y es baja en leche de vacas no infectadas.

Se determinó la relación entre la concentración de NAGasa en leche y el estado de infección de los cuarterones de la ubre. Aunque los valores de NAGasa diferían entre los cuarterones infectados o no, las diferencias eran solo significativas entre aquellos infectados con *St. agalactiae* y otros estreptococos. No se encontraron valores base de NAGasa que permitiesen clasificar el estado de infección de más del 65% de los cuarterones. El test de NAGasa dió solo resultados fiables para los cuarterones infectados crónicamente con *S. agalactiae* y reflejó el daño causado en el epitelio secretor (Corbellini et al, 1987).

El ensayo para NAGasa realizado por Berning et al (1993) fue esencialmente como el descrito por Hurley and Grieve en 1987. La concentración media de la actividad de la enzima cambió significativamente con el tiempo, disminuyendo durante la primera semana de lactación y permaneció constante a lo largo del resto de la lactación. La actividad de la NAGasa en leche de vaca estaba altamente relacionada con los SCC en leche (Callieri et al, 1987), habiéndose propuesto como test de diagnóstico para estimar el SCC en leche y el daño tisular mamario resultante de la inflamación (Kitchen et al, 1980). Los resultados de este estudio sugieren que el uso de la actividad de la NAGasa como indicador de mastitis debe tener en cuenta el rápido declive en la actividad enzimática que se produce durante los primeros días post-parto y que coincide con el periodo de máxima susceptibilidad a una IMI (Mc Donald & Mc Donald, 1975)

Se examinaron las transformaciones alternativas de la NAGasa para mejorar su eficacia en el diagnóstico de la mastitis (Berning et al, 1993). Se mejoró su sensibilidad con una distribución de frecuencias de Gauss y varianzas de subclases uniformes. El análisis de transformación de la NAGasa se describió de acuerdo con Box y Cox (1964) y se aplicó el

SCC según Ali&Shook (1980). El análisis de los datos se hizo por el procedimiento SAS de modelos lineales (1990). Los principales resultados de este estudio son la constatación de la distribución de frecuencias extremadamente sesgada en la actividad de la NAGasa en leche, lo que requiere una transformación logarítmica antes del análisis estadístico y que se mostró como altamente efectiva como indicador de mastitis y la validación de hipótesis.

Otros indicadores de mastitis con base fisicoquímica citados en la literatura son la determinación de sodio y potasio en leche y su relación con la SCC para monitorización de mastitis subclínica. El sodio era el parámetro más estrechamente relacionado con el SCC y se recomendaba para usar en programas de investigación de mastitis (Corbellini et al. 1984).

ANEXO I. ANALISIS DE COSTE DE LA MAMITIS Y SU PREVENCIÓN EN REBAÑOS LECHEROS.

Muchos investigadores han estimado el coste de los efectos clínicos y subclínicos de la mastitis (Blosser, 1979; Jasper et al, 1982; Janzen, 1970) mientras que otros se han dedicado principalmente solo a los efectos clínicos de la mastitis (Miller and Sem, 1990). Las diferencias citadas en los costes de componentes de la mastitis pueden explicarse, en parte, por la diversidad de métodos de estima y de enfoque. Se intentaron estimar los costes de los componentes de la prevención de la mastitis; de la mastitis por año/vaca para todos los casos clínicos, tipo de organismo e infecciones mixtas; de los componentes de un episodio clínico de mastitis global y la incidencia de la mastitis clínica por tipo de organismo y por infecciones mixtas; también valoraron el tamaño del rebaño sobre los costes de los componentes (Miller et al, 1993).

En los costes de prevención incluyeron las categorías de trabajo del ganadero, productos preventivos y servicios veterinarios. Las estimas de categoría de coste de componente para mamitis clínica fueron por vacas muertas, destrucción del cadáver, vacas llevadas al matadero (transporte), servicios y productos veterinarios, trabajo del ganadero y pérdida de leche. Los métodos para estimar los costes anuales por vaca-año de una muestra ya se utilizaron en estudios previos (Miller and Dem, 1990).

La prevención de la mamitis constituyó el 48% de los costes referidos a la prevención de todas las enfermedades bovinas. La mamitis producida por infecciones mixtas fue la más costosa sobre la base de vaca-año, suponiendo el 35.5% de los costes generados a los ganaderos por casos clínicos, seguido por casos de mamitis por *E. coli* (el 21.3%), por estreptococos esculin-positivos (principalmente *S. uberis*) (el 6.4%), por *Klebsiella spp* (el 5.7%), estreptococos esculin-negativos CAMP negativos (*S. dysgalactiae* principalmente), por *Enterobacter spp* (el 4.8%), los estafilococos coagulasa negativos (el 4.1%), los estafilococos coagulasa positivos (el 3%), *S. agalactiae* (el 2.5%), *Bacillus spp* (el 1.2%) y cultivos negativos (no aislados) (el 8.6%). Los costes por vaca-año fueron los más elevados por mamitis causadas por *E. coli* como único patógeno.

En general, los costes mayores por vaca-año variaron en función del estrato población del rebaño y del agente etiológico de la mamitis; no obstante, la mamitis causada por microorganismos ambientales fue la más costosa. Los costes por episodio clínico también variaron según el estrato población. Los mamitis por estafilococos fueron claramente costosas en rebaños grandes, mientras que para rebaños medios fue mucho menor el coste.

El examen de la incidencia de mastitis clínica reveló que el tipo más común fue de las infecciones mixtas. Los grandes valores obtenidos para los costes de las mastitis producidos por tales infecciones sugirieron una subestima de los costes para los patógenos específicos individuales de mastitis.

La pérdida de producción láctea se estimó en un valor mucho menor al del 65-70% sugerido por Blosser (1979) y Jasper et al (1982). Esta discrepancia sugirió que el bajo valor de pérdida de producción puede reflejar una subestima de los costes de la mastitis clínica. Se requieren estudios de campo extensivos a gran escala para estimar los costes de la mastitis (Miller and Dern, 1990; Hurd et al, 1991; Kaneene and Hurd, 1990). Es importante reconocer que no todos los costes gravados en los ganaderos debido a la mastitis clínica son prevenibles: hay límites sobre el beneficio que puede alcanzarse con la prevención.

La eficacia-coste del control de mastitis no se discute, pero los datos obtenidos de estos estudios habrán de aprovecharse para proyectar los impactos de los episodios clínicos en nuevos programas.

OBJETIVOS:

- 1) Evaluación de la distribución temporal de los patógenos mamíticos tipo y su prevalencia/incidencia.
- 2) Detección de presuntos estados de infección mamítica subclínica, con absoluta fiabilidad y en un período breve de tiempo, mediante el desarrollo de un kit de diagnóstico por ELISA sandwich de captura frente a *S. agalactiae*, uno de los principales patógenos mamíticos, para utilizarlo como técnica de investigación en estudios de campo a gran escala.
- 3) Comparación de la rentabilidad de los diversos sistemas de diagnóstico clásicos frente a las nuevas herramientas de diagnóstico rápido y su ratio esfuerzo investigador/mejora de la fiabilidad hasta presunción absoluta de identificación del patógeno.
- 4) Realizar un diseño que permita analizar los datos mediante un análisis multivariante de factores para resumir la información de una matriz de datos de X variables y reducirla a un pequeño grupo de factores. A partir de ahí se valorarían las puntuaciones factoriales. Los factores representan a las variables, con una pérdida mínima de información. Las variables son X gérmenes identificados, dos medidas de recuento de células somáticas en leche y la determinación de presencia/ausencia de enfermedad en las vacas de los establos muestreados.

MATERIAL Y METODOS:

Como los programas de control de mastitis no afectan sino levemente el índice de mastitis clínica (Erskine et al, 1988; Hogan et al, 1989; Schukken et al, 1990) y existe una amplia variación en dicho índice en rebaños con baja SCC (Erskine et al, 1988; Hogan et al, 1989), fue necesario evaluar los factores de riesgo que provocan dichas variaciones. Las técnicas epidemiológicas ofrecen importantes herramientas para estudiar los indicadores de riesgo del rebaño lechero (Rothman, 1986). La identificación de estos indicadores en el rebaño contribuyen a la formulación de la patogénesis de mastitis clínica con bajos SCC en rebaños y potencian así las propuestas de mejora de los programas de control mastítico. Los datos obtenidos después del análisis bacteriológico se modelan como el índice de mastitis por establo.

Los factores riesgo evaluados fueron:

- 1) El manejo general (tamaño del rebaño, raza, tipo de terreno y clima donde está establecida la explotación), tipo de línea de ordeño, gestión de la explotación).
- 2) Condiciones higiénicas del establo y frecuencia y procedimientos de desinfección de los cubículos del rebaño.
- 3) Tipo de alimentación de las vacas lactantes y secas.

- 4) Manejo de todas las vacas antes y después de la preñez y parto (presencia de maternidad o de cuadros de enfermedad, encame en el área de reproducción, limpieza y desinfección en el área de reproducción, ordeño en dicha área, procedimiento de secado, tratamiento de la vaca seca, chequeos de mamitis en el período seco, desinfección de pezones, patrón de reproducción estacional).
- 5) Protocolo de ordeño y precauciones con vacas presuntamente mamíticas respecto a un posible contagio a través de la máquina de ordeño.
- 6) Datos de producción y BTSCC en el período de muestreo.
- 7) Historial clínica de las vacas lactantes durante el período de muestreo.

Metodología de muestreo:

Se tomaron muestras de leche de tanque de mezcla refrigeradas a 4°C en dos establos seleccionados en ayuntamientos cercanos al Centro de Investigaciones Agrarias de Mabegondo (CIAM) donde se realizó el protocolo experimental de este trabajo, desde la primavera de 1994 a la de 1995. Los establos fueron denominados LP y LSC. La periodicidad de muestreo fue semanal y el volumen de muestra 50 ml por establo y día de muestreo.

Otro grupo de variables interrelacionado con el anterior fue el que determinó el control de calidad de las prácticas de ordeño, como parte principal del seguimiento del programa de control de mamitis establecido.

Análisis de los datos:

De dos tipos: cualitativo (preparación y descripción del material, síntesis de los datos y aplicación de los tipos de análisis estadístico (ANOVA, análisis factorial, análisis de componentes principales, método de rotación varimax (para maximizar la varianza de los factores, rotando la matriz factorial (que indica la relación entre los factores y las variables) y así mejorar la interpretación de los datos)) y cuantitativo (ligado a las hipótesis de trabajo).

Se creó una base de datos con un directorio MAMITIS. El tratamiento de los datos y los gráficos correspondientes a índices de prevalencia/incidencia por establo y patógeno se procesaron con la hoja de cálculo EXCEL.

El análisis estadístico se realizó con un modelo de análisis factorial multivariante, con el recuento celular total y pico de los establos LP y LSC y los patógenos mamíticos identificados. En el análisis factorial y de componentes principales se empleó el método varimax. El procesamiento de la información se realizó con un paquete SPSS. Las puntuaciones factoriales se utilizaron como predictores en un análisis de regresión múltiple. Como variable dependiente se seleccionaron los patógenos mamíticos identificados, combinándolos con las variables independientes para desarrollar una predicción del estatus sanitario de las vacas.

Procesamiento de las muestras y técnicas de análisis:

El protocolo de trabajo seguido en el análisis de las muestras siguió el método estandarizado en el CIAM, incrementando volumen de inóculo y con enriquecimiento previo en medio líquido no selectivo de las muestras, con incubación durante 24 horas a 37°C, para aumentar la recogida de aislados microbianos en dichas muestras.

Las muestras de leche fueron sembradas en alícuotas de 0.5 ml en tubos de caldo tripticasa soja (TSB) (Difco, MI, Estados Unidos) en dilución 1/10 y se incubaron durante 24 horas a 37°C en ambiente aeróbico. Paralelamente se realizó la determinación del BTSCC total y diferencial de esa muestra en el contador Coulter, siguiendo el protocolo estándar.

De cada tubo de TSB se tomó un inóculo de 0.1 ml en asa de siembra y se sembró en placas Petri de agar triptono soja conteniendo un 5% de sangre de carnero estéril (ATSS) y un 0.1% de esculina (Sigma, MO, Estados Unidos) para la identificación de gérmenes Gram positivos (cocos y bacilos). Otro inóculo de 0.1 ml se sembró en placas de agar McConkey para el aislamiento de gérmenes Gram negativos (principalmente bacilos). Ambas placas (dos por muestra) se incubaron aeróbicamente a 37°C durante 24 horas. Las colonias aisladas en primocultivo fueron examinadas para su diferenciación, primero con la tinción de Gram y

luego con observación microscópica para características morfológicas del germen. Los cocos Gram positivos así identificados fueron sometidos a las pruebas de la catalasa (kit de determinación de la catalasa de Biomerieux, Francia) para división en dos grandes grupos: estafilococos y estreptococos (los estafilococos son catalasa positivos y los estreptococos catalasa negativos). Los estafilococos a su vez fueron diferenciados a su vez de los micrococcos por la prueba de la oxidasa (los micrococcos son oxidasa positivos) por ser los que poseen importancia epidemiológica en la mastitis. Los estafilococos también se sometieron a la prueba de la coagulasa (test en tubo con suero de conejo con EDTA: los coagulasa positivos forman un coágulo o clot a las pocas horas de ser inoculados en el tubo con el suero), para diferenciarlos en coagulasa negativos y positivos.

Los cocos Gram positivos ya diferenciados se sembraron, por siembra en estria, en placas con medios sólidos selectivos (para estafilococos se utilizaron el BP (Baird-Parker medium (Pronadisa)) y el agar rojo fenol manitol con Cl Na₂ (al 6.5%); para estreptococos se utilizaron el medio agar bilis esculina (BEA) (Difco), agar estreptococcus K-F (Pronadisa), medio Slanetz y Bartley (Difco), medio Granada (según formulación descrita por De la Rosa et al, 1994), medio SMA (Wilson and Jeffrey, 1987) y el caldo Todd-Hewitt (BBL).

Los bacilos Gram negativos, principalmente coliformes, se sembraron en agar Levine y agar glucosa bilis rojo violeta, como medios sólidos selectivos. Con medios líquidos diferenciales (como el EC (E. coli) medium) y la valoración de la prueba del indol, se investigó presencia de E. coli. También se valoraron la motilidad, la utilización del citrato (medio citrato de Simons) y la actividad de la ureasa, así como reacción a diversos azúcares y detección de producción de ácido sulfhídrico con el medio TSI.

Las colonias aisladas en medios selectivos fueron identificadas a partir de la

caracterización bioquímica (bien con pruebas selectivas: producción de pigmento, utilización anaeróbica de la glucosa, patrón hemolítico sobre agar sangre (para los estafilococos coagulasa positivos y estreptococos), etc, o bien con sistemas miniaturizados (API system).

Desglosando por grupos de gérmenes, los estafilococos coagulasa positivos se identificaron a partir de aislamiento principalmente en medio BP, con características culturales típicas, reacción positiva al test de la coagulasa, y caracterización por el API STAPH. Solo se identificó una especie de interés: *S. aureus*.

Los estafilococos coagulasa negativos se identificaron a partir de aislamiento en medio BP, sin patrón hemolítico en agar sangre (gamma hemolíticos), reacción negativa al test de la coagulasa, y caracterización por el API STAPH. Se identificaron dos especies de interés en la mamitis: *S. epidermidis* y *S. xylosus*.

Los estreptococos se identificaron por la prueba de CAMP, hidrólisis o no del hipurato y de la esculina, patrón hemolítico en agar sangre y confirmación por el API 20 STREP. Se identificaron una especie de patógeno principal o contagioso, *S. dysgalactiae*, y varias especies de patógenos ambientales (*Enterococcus faecalis*, *E. faecium*, *S. bovis* y *S. acidominimus*). Otra especie caracterizada pero como flora normal de la ubre fue *L. lactis*. La caracterización serológica de los estreptococos se realizó con el kit Slidex Strepto kit 2, de Biomerieux, para agrupación de las diferentes especies en grupos serológicos de Lancefield. El kit es un test de aglutinación en látex en porta, estableciendo previamente la eficacia del método. Los estreptococos fueron testados colocando 1 gota de reactivo de látex de los grupos serológicos A,B,C,D,E y G en un porta, mezclándolo con el inóculo de 1-2 colonias extraídas de un cultivo puro de cada una de las cepas examinadas. Se consideró negativo el test a un grupo dado si no había aglutinación pasado un tiempo razonable.

Algunos aislados de estafilococos fueron confirmados mediante un sistema similar, el Slidex Staph kit 2.

Para la caracterización por el sistema API 20 STREP y API STAPH, se siguió el protocolo marcado por el fabricante, y los perfiles numéricos obtenidos a partir de la conclusión de positivo/negativo de la lectura de las reacciones enzimáticas obtenidas después de incubación de la galería del API a 37°C durante 24 horas (API STAPH) o a 4 horas (presuntiva)-24 horas (confirmativa)(API 20 STREP) fueron comparados con la base de datos existente. Para los estafilococos se ensayaron las siguientes reacciones bioquímicas: fermentación de glucosa, fructosa, manosa, maltosa, lactosa, trehalosa, manitol, xylitol, melibiosa, rafinosa, xilosa, sacarosa, alfa metil glucósido y N-acetil glucosamina, reducción de nitratos, hidrólisis de la arginina y la urea, actividad de la fosfatasa y formación de acetoina del piruvato (reacción del VP), reacción de la oxidasa y reacción a la LSTR.

Para los estreptococos las reacciones bioquímicas ensayadas fueron reacción de VP, hidrólisis del hipurato y de la esculina, producción de B-glucosidasa, PYR, alfa-galactosidasa, B-glucuronidasa, B-galactosidasa, fosfatasa alcalina, leucina arylamidasa, hidrólisis de la arginina, y utilización de la ribosa, L-arabinosa, manitol, sorbitol, lactosa, trehalosa, inulina, rafinosa, almidón y glicógeno. La hemólisis se determinó sobre agar sangre. El test de CAMP se realizó según lo establecido por Brown et al (1981). Todos los tests que no supusieron la identificación específica fueron objeto de una segunda lectura después de otras 24 horas de incubación y se sometieron también al análisis con el sistema API ZYM para confirmación del uso de carbohidratos.

Los bacilos Gram negativos se identificaron de forma análoga a la de los cocos y cocobacilos Gram positivos. Los aislados en primocultivo en agar McConkey fueron identificados por caracterización bioquímica (sistemas API 20E y API 20NE). Se tomaron 1-2 colonias de cada placa bien aisladas y se preparó un inóculo en agua destilada que fue inoculado en la galería del API siguiendo las instrucciones del fabricante. Los aislados se sometieron a las siguientes reacciones bioquímicas: B-galactosidasa, hidrólisis de la arginina (ADH), de la lisina (LDH), y la ornitina (ODH), la utilización del citrato, reacción de la ureasa, la formación de ácido sulfhídrico y la detección de la presencia de triptófano desaminasa, la prueba del indol, la reacción de VF, la gelibiosa, la fermentación de la glucosa, el manitol, el inositol, el sorbitol, la rhamnosa, la sacarosa, la melibiosa, la amygdalina, la arabinosa y el resultado del test de la oxidasa. Cuando los perfiles numéricos obtenidos después de la lectura y comparación de la base de datos, de modo análogo a los otros sistemas API, fueron determinantes de identificación específica, se complementó ésta con el ensayo de la reducción de nitritos, el test de movilidad y la reacción de oxidación/fermentación en medio OF.

La presencia de otros bacilos (corinebacterias,...) se estimó por el siguiente método: identificación de la morfología colonial por microscopia (presencia/ausencia de esporas, forma, tamaño y disposición del bacilo,...) y observación de las características culturales, en medios sólidos L-S (para *Lactobacillus*), ATSS y agar Tinsdale (para *Corynebacterium*), medio LEA (para *Listeria*), etc,...; confirmación de los resultados de las pruebas de la catalasa y oxidasa y del ambiente de cultivo (anaerobio estricto, anaerobio facultativo o aerobio). Para los bacilos Gram negativos no pertenecientes a las enterobacteriaceas, como *Aeromonas* y *Vibrio*, aislamiento en medios específicos (medio TCBS y medio *Aeromonas* (Oxoid)) y

confirmación bioquímica por el API 20NE.

La posible presencia de hongos del gno *Candida* se valoró por la observación de los caracteres morfológicos por microscopía y características de cultivo en el medio selectivo OGYE.

El análisis microbiológico permitió detectar la posible presencia de IMI a partir de las muestras de leche cruda refrigerada tomadas del tanque, siguiendo un esquema de 4 categorías: a) muestra libre de patógenos mamíticos principales; b) presencia de 1 patógeno principal en cultivo puro (*S. aureus*/*St. agalactiae*); c) presencia de ambos tipos de patógenos principales; d) presencia de una infección mixta. En todas las categorías se parte del análisis de al menos dos muestras de leche consecutivas del tanque donde se habiesen identificado claramente algún patógeno presente ocasionalmente en una IMI bovina por referencia.

EL RECUENTO DE SCC se realizó a nivel del tanque (BTSCC) para todas las muestras tomadas de ambos establos y se comparó con los registros de BTSCC de otro establo (FM) que sirvió como control positivo, y los registros de un laboratorio de referencia obtenidos en el mismo periodo. Los BTSCC fueron determinados utilizando un Coulter Counter (Coulter Ltd, Inglaterra), estableciendo como valor umbral límite de ausencia de IMI los 500.000 células por ml. Se obtuvieron las medias geométrica y aritmética y se realizó la transformación logarítmica en base 10 y se valoró con un test ANOVA.

EL ELISA. Se utilizó la técnica explícitamente para detección de antígenos de *S. agalactiae* en leche de tanque de mezcla de un establo. El método ELISA fue esencialmente similar al desarrollado por Rainard et al (1991) y Zorah et al (1993) adaptado al presente estudio.

confirmación bioquímica por el API 20NE.

La posible presencia de hongos del gno *Candida* se valoró por la observación de los caracteres morfológicos por microscopía y características de cultivo en el medio selectivo OGYE.

El análisis microbiológico permitió detectar la posible presencia de IMI a partir de las muestras de leche cruda refrigerada tomadas del tanque, siguiendo un esquema de 4 categorías: a) muestra libre de patógenos mamíticos principales; b) presencia de 1 patógeno principal en cultivo puro (*S. aureus*/*St. agalactiae*); c) presencia de ambos tipos de patógenos principales; d) presencia de una infección mixta. En todas las categorías se parte del análisis de al menos dos muestras de leche consecutivas del tanque donde se hubiesen identificado claramente algún patógeno presente ocasionalmente en una IMI bovina por referencia.

EL RECUENTO DE SCC se realizó a nivel del tanque (BTSCC) para todas las muestras tomadas de ambos establos y se comparó con los registros de BTSCC de otro establo (FM) que sirvió como control positivo, y los registros de un laboratorio de referencia obtenidos en el mismo periodo. Los BTSCC fueron determinados utilizando un Coulter Counter (Coulter Ltd, Inglaterra), estableciendo como valor umbral límite de ausencia de IMI los 500.000 células por ml. Se obtuvieron las medias geométrica y aritmética y se realizó la transformación logarítmica en base 10 y se valoró con un test ANOVA.

EL ELISA. Se utilizó la técnica explícitamente para detección de antígenos de *S. agalactiae* en leche de tanque de mezcla de un establo. El método ELISA fue esencialmente similar al desarrollado por Rainard et al (1991) y Zorah et al (1993) adaptado al presente estudio.

Se aislaron cepas nativas de *S. agalactiae* en muestras de leche del establo colaborador establecido como control positivo, y se compararon respecto a las cepas de referencia obtenidas de la NCFB (National Collection of Food Bacteria, Inglaterra) (NCTC 1348, 1521 y 1523) y de la CECT (Colección Española de Cultivos Tipo, Valencia) (NCTC 8181, ATCC 13813, NIRD 1961) aislados de casos de mastitis bovina, y se caracterizaron bioquímicamente con un API 20 STREP (para confirmación).

Para aislar el antígeno principal responsable de la patogenicidad de *S. agalactiae* en casos de IMIS, se utilizaron los conocimientos previos sobre el papel inmunogénico de una proteína localizada en la pared celular de la bacteria, denominada proteína X, presente frecuentemente en las cepas de *S. agalactiae* causantes de mastitis bovina y útil en el tipado de esas cepas. Se utilizó como antígeno para obtener un antisuero en vaca sensibilizado a dicha proteína. Dicho suero sirvió como suero de referencia para la titulación del ELISA sandwich (mediante un ELISA indirecto).

Para obtener el antígeno fue necesario purificar la proteína, proceso que se hizo como sigue: Previa lisis enzimática de la bacteria con lisozima (según el protocolo de Penlava y Saba, 1982) y centrifugación (a 3000 g durante 20 minutos) se eliminaron los pellets obtenidos por precipitación con sulfato amónico y se decantó el sobrenadante, concentrándolo como solución proteica mixta por diálisis frente a PBS (BBL) y posteriormente ultracentrifugando (a 40.000 g durante 10 minutos en una ultracentrifuga Beckman). Se cuantificó el concentrado proteico por el método de Lowry modificado por Peterson, utilizando BSA (Sigma, MO) como estándar proteico con un kit de Sigma. El complejo se purificó a su vez en dos etapas: primera, en cromatografía de exclusión en gel Sephacryl S-300 (Pharmacia LKB, Suecia); segunda, una cromatografía de afinidad (estudios previos (Lautrou et al, 1991) demostraron

por SDS-page e inmunoblotting la estructura de la proteína X, con una banda principal con peso molecular de 200 KDa. Obtuvieron un anticuerpo monoclonal, el mabIII B3, específico de las cepas de *S. agalactiae* que portaban la proteína X, a partir de la inmunización con ese antígeno en vacas y el procesamiento del antisuero correspondiente. En nuestro estudio, se utilizó este anticuerpo, frente al extracto crudo de la proteína X parcialmente purificada por cromatografía de exclusión en gel, pasado a través de una columna de afinidad, acoplado a la matriz proteína A-Sepharose-CL6B (Pharmacia). La columna fue lavada con tampón 1.5 M glicina-Cl Na, con pH 8 y la fracción retenida eluida con tampón de ácido cítrico 0.1 M (pH 3). Se leyeron las absorvencias de las fracciones obtenidas, a una densidad óptica de 280 nm, en cubeta de cuarzo en un espectrofotómetro Beckman. Se calculó la concentración de la proteína X así purificada a partir de su absorvencia, mediante la fórmula $A_{280\text{ nm}} = c \cdot E_{280} \cdot l$ siendo l el paso óptico de la cubeta del espectrofotómetro e igual a 1 cm. (Ley de Beer-Lambert), y E_{280} el coeficiente de extinción molar de la proteína a 280 nm de D.O. (densidad óptica) y c la concentración de la proteína X.

La caracterización del antígeno se realizó por una SDS-PAGE, tal como fue descrita por Laemli (1970) en un gel de poliacrilamida del 6% y tinción de las proteínas fijadas con azul Coomassie G-250. Los pesos moleculares fueron estimados usando una curva de calibración construida con los siguientes marcadores estándares proteicos (citocromo c, anhidrasa carbónica, BSA, fosforilasa B, IgG y miosina (presentes en un kit comercial de Sigma)). Se completó el protocolo con un inmunoblotting realizado según la técnica de Towbin et al (1984) y la adaptación de Lautrou et al (1991). Se verificaron los blots (transferencias) y se localizaron los marcadores de peso molecular. Se reveló el antígeno utilizando una técnica de acoplamiento con anticuerpos primario (IgG bovina) y secundario

(antisuero de ratón anti-bovino) conjugado con peroxidasa (Sigma, MO), e incubando en tampón TBS-T, con un 4% de PEG 6000, posteriores lavados con TBS y revelación con un tampón substrato que utilizó como cromógeno la diaminobenzidina.

El ELISA usado para detección de las cepas portadoras de proteína X se basó en la técnica doble sandwich descrita por Voller et al (1980) y modificada:

Se tapizaron las placas microtiter de 96 pocillos con fondo en U (Nunc, Dinamarca), previamente sensibilizadas con aglutinina de germen de trigo (WGA) (Sigma, MO), por su gran afinidad por los antígenos tipo de *St. agalactiae*, con células enteras de *St. agalactiae* inactivadas por exposición a baño María a 60°C, y que se suspendieron en PBS(modificación de Dulbecco) (BBL), se dispensaron en volúmenes de 100 microlitros/pocillo en las placas y posteriormente se incubaron a 4°C durante una noche. Las placas así tapizadas se lavaron e incubaron durante 30 minutos a 37°C con PBS con 0.5% de gelatina (Sigma, MO) para reducir la adsorción inespecífica de proteínas.

Después de cada etapa de incubación se lavaron las placas 3 veces con PBS-T (tampón de lavado). Se añadieron 100 microlitros/pocillo de suero bovino a testar previamente diluido 1/10 en tampón de dilución concentrado 2X (concentración final del tampón 2X: 200 microlitros de PBS 10X a pH 7.4; 40 ml de timerosal al 0.5%; 10 gr. de BSA; 2 ml de Tween 20; 100 mg de rojo fenol; 2 M de ClNa, diluidos en 760 ml de agua destilada, y todo ajustado a pH=8) y el antisuero de conejo a Ig bovina sensibilizado. Para obtener la señal específica, se añadieron 50 microlitros/pocillo de una suspensión del tampón de incubación (PBS con 0.05% de Tween 20, a pH 7.4) conteniendo una dilución 1/250 en placa del conjugado (compuesto por un anticuerpo monoclonal anti-Ig bovina en ratón conjugado con fosfatasa alcalina (Sigma, MO), según protocolo preestablecido) Las placas se incubaron durante 2 horas a

temperatura ambiente y se lavaron 4 veces con tampón de lavado 0.1 X (todos los componentes del tampón 2X diluidos 1/20 en agua destilada (890 ml) y con timerosal al 0.5% (20 ml)) y agua destilada, añadiéndoles 100 microlitros/pocillo de tampón substrato 1X (13 gr. de ácido cítrico, 28 gr de citrato sódico, 20 ml de timerosal al 0.5%, 1 ml de peróxido de hidrógeno, todo diluido en 1 l. de agua destilada y ajustado a pH=4.8) que contenía diluido como cromógeno p-nitrofenil fosfato (pNPP) (concentración 1 mg/ml) (Sigma, MO). La reacción enzimática coloreada desarrollada se paró después de 30 minutos a t ambiente con 50 microlitros/pocillo de sosa 3N. Los resultados se leyeron en un espectrofotómetro Titertek Multiskan a 3 longitudes de onda (450, 414 y 620 nm). La absorbancia a 620nm se midió para corregir las posibles variaciones entre pocillos en la lectura de cada microplaca. Todas las muestras fueron procesadas por duplicado y de los valores leídos se calculó la media y la desviación típica. La absorbancia a 450 nm sirvió para calcular los valores de absorbancia a 414 nm mayores o iguales a 2 por aproximación, que son los que dieron una señal más fuerte en la placa. Los pocillos que recibieron PBS solo en lugar de suero bovino se utilizaron como blancos. La media de las absorbancias de las muestras duplicadas se comparó con un valor predeterminado de cutoff para determinar si la muestra era positiva al antígeno usado o no. Este punto de cutoff se tomó a una densidad óptica cuya lectura daba 0.227, que era el valor medio de ELISA más 3 desviaciones estándar para el n° de muestras analizado (con cultivo negativo y/o SCC menor de 500.000 cél/ml). Así, el 99% de las muestras normales (SCC menor de 500.000) produjo valores de densidad óptica menores a 0.227, cuando se testaron por ELISA para detectar el antígeno antecitado.

La sensibilidad, la especificidad y el ratio de probabilidad se calculó para el cultivo

microbiológico y el SCC de las muestras que fueron testadas por ELISA.

Análisis estadístico. Tuvo dos partes: 1) obtención de datos de medias aritméticas y geométricas, así como desviación y error estándar de los SCC en los establos LP y LSC.

2) El ANOVA, el análisis factorial y el análisis de componentes principales (PC) para un modelo de rotación tipo varimax, utilizando el test de esfericidad de Barlett y el índice KMO, de adecuación de la muestra, tal como se señala en las tablas de resultados en el apartado de ANEXOS, con los SCC (factores SCCtotales y SCCpico) en ambos establos como variable cuantitativa y la identificación de los gérmenes presentes en las muestras de leche como variable cualitativa.

El ANOVA se hizo de acuerdo con el siguiente modelo:

$Y_{ijkl} = U + H_i + A_j + B_k + C_l + (AB)_{ij} + (AC)_{jk} + (BC)_{kl} + e_{ijkl}$, siendo Y = log decimal de SCC.

U = media esperada, H = efecto de rebaño absorbido, A, B y C = influencia de las clases de etapa de lactación, (AB), (AC) y (BC) = interacciones de 2 factores y e = término de error.

Para realizar el análisis factorial, se tuvieron en cuenta los siguientes pasos:

- 1) Se calculó la matriz de correlaciones entre todas las variables, a partir de la matriz de datos originales. Se examinó esa matriz y se calcularon el test de Bartlett y el índice KMO.
- 2) Extracción de los factores necesarios para representar los datos.
- 3) Se realizó la rotación de factores con el método varimax para facilitar su interpretación.
- 4) Se calcularon las puntuaciones factoriales para cada muestra y que se utilizaron en análisis posteriores.

RESULTADOS

Los resultados obtenidos con el análisis microbiológico y el SCC de las muestras de los establos LSC y LP a lo largo del periodo de muestreo se citan en la Tabla I. Se han aislado numerosos casos de cocos Gram positivos tanto en las muestras de leche de tanque de ambos establos como en la leche de las vacas, suponiendo un total de 121 aislados entre los dos establos sobre un montante de 67 muestras de leche de tanque (27 en el LSC y 40 en el LP), lo que significa una fuerte prevalencia de estos gérmenes y que en casi todas las muestras de leche se detectaron aislados de diversas especies, lo que dificultó la búsqueda del agente causal primario en aquellos casos donde se detectaron SCC tan elevados que se correspondían con periodos de IMIs. Los aislados se desglosaron en cepas de estafilococos, estreptococos, coliformes, corinebacterias y una miscelánea de bacilos Gram positivos y negativos.

En los estafilococos predominaron los coagulasa negativos (*S. epidermidis* y *S. xylosus* (en total 33 aislados) seguida en proporción por coagulasa positivos (siempre se detectó *S. aureus*) (24 casos) con escasa variabilidad fenotípica en su caracterización. También se aislaron 1 caso de *S. lentus*.

Hubo algunos aislados de los generos *Micrococcus* y *Streptococcus* que no se llegaron a identificar a nivel de especie.

Los estreptococos fueron aislados en la mayoría de las muestras, bien en forma de enterococos (*Enterococcus faecalis*/*E. faecium*) (en total se detectaron 9 aislados en el establo LP (40 muestras de leche) y 5 aislados en el establo LSC (sobre 27 muestras de leche).

como flora láctica normal (*L. lactis*) (se identificaron 16 aislados en el establo LP y 6 en el establo LSC), o como patógenos mamíticos (un aislado de *S. dysgalactiae* en cada establo. No se aislaron *S. uberis* ni *S. agalactiae* de cepas nativas en ambos establos, aunque se caracterizó fenotípicamente las cepas de referencia de *S. agalactiae* utilizadas en el trabajo experimental, contrastando con perfiles bioquímicos y pruebas de aglutinación.

Se identificaron, sin embargo, un aislado de *S. agalactiae* y uno de *S. uberis* en el establo control FM. La cepa de *St. agalactiae* se aisló en tanque y la de *St. uberis* en una vaca con sintomatología clínica de mastitis.

Los corinebacterias estuvieron representadas por 4 aislados de *Corynebacterium bovis*, identificados en el establo LP y 2 en el establo LSC y 1 aislado de *C. xerosis*. También se detectaron 3 aislados de *Lactobacillus casei* en el establo LP y 1 en el LSC.

Se detectó como un hecho aislado una cepa de *S. pyogenes* B-hemolítico, probablemente de origen humano que contaminó la vaca o la muestra de leche, en el establo LSC.

En conjunto, los estafilococos y los estreptococos identificados supusieron 37 aislados en el establo LSC y 64 aislados en el LP, sobre un total de 27 y 40 muestras de leche respectivamente, lo que indica una elevada prevalencia e incidencia de los cocos Gram positivos en ambos establos.

Se encontró una elevada variabilidad en los perfiles bioquímicos de las cepas nativas aisladas respecto a las cepas tipo referencia.

Así, el aislado de *S. agalactiae*, en el establo FM, presentó una baja B-hemólisis, y una escasa capacidad de aglutinación en la prueba de la aglutinación en látex. También presentó fermentación de la lactosa.

En el aislado de *S. uberis* el perfil del API fue totalmente atípico: producción de ácido piroglutámico, utilización de la fosfatasa alcalina, fermentación de la arabinosa, inulina y rafinosa fueron los tests cuya reacción fue contraria al perfil tipo establecido en la base de datos del API.

Los aislados de *S. dysgalactiae* presentaron un perfil básico similar al de las cepas tipo.

Los estreptococos ambientales (principalmente enterococos) presentaron también una amplia variabilidad en su caracterización fenotípica: se aislaron 3 perfiles principales de enterococos (7043711, 7143715 v 7107755) respecto al perfil tipo API. Las diferencias principales se observaron en la reacción positiva de la leucina arilamidasa en *Enterococcus faecalis* y negativa en *E. faecium*, la fermentación de la rafinosa solo en *E. faecium* y la reacción de B-hemólisis en *E. faecium* y algunos aislados de *E. faecalis*.

Los aislados de *S. bovis* presentaron reacción negativa a la B-galactosidasa, una característica más propia de *S. equinus*.

En cuanto a los estafilococos, las cepas de *S. epidermidis* presentaron un perfil igual en el 80% de los casos (fermentación de la glucosa y la fructosa, utilización de la manosa, maltosa y lactosa, no fermentación de la trehalosa, el xylitol y el manitol, reacción positiva de la fosfatasa alcalina, no producción de acetoina, fermentación de la xylosa y de la sacarosa, hidrólisis de la arginina y de la urea y utilización del alfa metil glucósido.

S. xylosum presentó la mayor variabilidad fenotípica, con aislados que fermentaban el manitol o no, eran positivos (el 80% de los casos) o negativos a la reacción de la fosfatasa alcalina (el 20%), producían acetoina a partir del piruvato (reacción del VP) (el 80% de los casos) o no, hidrolizaban la arginina (el 100% de los casos), fermentaban la sacarosa (el 20%) e hidrolizaban la urea (el 60% de los casos).

Las cepas nativas de *S. aureus* presentaron escasa variabilidad fenotípica y solo se diferenciaron en el grado de beta-hemólisis en agar sangre y la capacidad de fermentación del manitol. No se utilizaron para la reacción del CAMP.

Los bacilos Gram negativos identificados pertenecían a las especies *E. coli* (su incidencia fue del 25% en el establo LP (11 aislados) y del 33% en el establo LSC (9 aislados), *Enterobacter sakazakii* (1 aislado en cada establo), *E. cloacae* (1 aislado en el establo LP (que supuso el 2.5% de los casos en ese establo)), *Klebsiella pneumoniae* (1 aislado en cada establo), *Serratia liquefaciens* (1 aislado en el establo LSC), *Aeromonas sobria* (2 casos en el establo LP (que supuso el 5% del total de casos) y *Hafnia alvei* (1 aislado en el establo LSC).

La identificación bioquímica de estos aislados guardó las pautas comunes establecidas en la tabla de lectura/identificación del API 20E. Así, de los coliformes (más del 90% del global de bacilos Gram negativos), *E. coli* fue la que presentó mayor variabilidad, debido en parte al nº de aislados que se identificaron en ambos establos, con diferencias ecológicas claras entre ellos, y por otra parte a las características del genoma de *E. coli*, cuya expresión fenotípica se concretó en diferencias de pigmentación de los aislados *in vitro* según el medio de cultivo utilizado (medio McConkey, medio Hektoen, medio EC, medio SS,...), la hidrólisis de la arginina y la lisina, la movilidad y la fermentación de diversos carbohidratos (melibiosa,

ramosa, sacarosa, rafinosa,...).

El gno. *Enterobacter* y los generos afines que fueron identificados entre algunos de los aislados se diferenciaron por la movilidad (positiva en los 3 aislados de *Enterobacter* y en el de *Serratia* y negativa en los de *Klebsiella* y *Hafnia*), la presencia del enzima deoxiribonucleasa (solo en los *Serratia*) y la utilización del citrato (negativa solo en *Hafnia*). Dentro del gno. *Enterobacter*, la diferenciación entre especies se observó por la presencia de pigmento amarillo en las colonias (*E. sakazakii*), la fermentación del sorbitol (solo la produjo *E. cloacae*) y del indol (solo en *E. sakazakii*). Del gno. *Klebsiella*, las cepas identificadas fermentaban la glucosa y utilizaban el citrato y el malonato y produjeron acetoina, por lo que se asignaron a la especie *K. pneumoniae sub. pneumoniae*. Del gno. *Serratia* se registró una variación en el perfil tipo de *S. liquefaciens* en la fermentación de carbohidratos tales como sorbitol, xylitol, melibiosa y xilosa (con reacción ambigua que tuvo que retestarse a las 48 horas). La cepa de *Hafnia* que se aisló presentó reacción positiva tardía de la utilización del citrato y de la producción de acetoina.

Los 2 aislados de *Aeromonas sobria* presentaban las características bioquímicas tipo del gno. *Aeromonas* (reducción de nitratos, hidrólisis de la gelatina, asimilación de la glucosa, del manitol y la maltosa, y ser oxidasa positivos) y su asignación a la especie *A. sobria* se realizó por su reacción negativa a la hidrólisis de la esculina fundamentalmente.

Se detectó un aislado de *Vibrio spp* en el establo LP, en base a su reacción positiva a la oxidasa, la no producción de gas a partir de la glucosa, la reducción de nitratos a nitritos, la fermentación de la sacarosa, la salicina, el inositol y la arabinosa, el crecimiento en medios específicos de *Vibrio* (TCBS), su inhibición del crecimiento por el factor O/129 en concentraciones de 150 microgramos y la hidrólisis de la esculina, pero no se pudo identificar

a nivel de especie por su variabilidad respecto al perfil bioquímico tipo establecido en el API20NE.

Sobre la base de la primera detección/aislamiento de las bacterias identificadas anteriormente, y comparando los hallazgos microbiológicos con el BTSCC medido en cada muestra, se observó que más del 50% de los aislados de *E. coli* (11 casos) se detectaron en los meses de primavera y verano y se correspondieron con BTSCC con un rango entre 700.000 y más de $3 \cdot 10^6$ cél/ml, lo que supuso una IMI per cada caso en algunas vacas de ese establo durante todo el periodo de muestreo. En ninguna muestra *E. coli* fue el único germen aislado (estuvo acompañado de estreptococos lácticos, estafilococos coagulasa negativos, enterococos, lactobacilos, estafilococos coagulasa positivos y *S. bovis*).

En la misma esfera de correlación entre SCC y aislados en el periodo de muestreo se siguió con las restantes especies bacterianas, de tal modo que para el resto de los coliformes, se encontraron los siguientes resultados (Para *E. sakazakii*, que apareció acompañando a estafilococos coagulasa positivo y negativos y a enterococos, el 100% de los aislados se detectaron en el mes de julio (1 caso) y en el de diciembre (1 caso), con BTSCC respectivos de $9 \cdot 10^5$ y de $1,8 \cdot 10^6$ células por ml, lo que supuso también la aparición de una IMI en cada caso. (Para *K. pneumoniae*, que apareció acompañando a estafilococos coagulasa positivos y negativos, el 100% de los aislados se detectó en el otoño (meses de octubre y noviembre) y solo en 1 caso su aparición coincidió con un BTSCC que supusiese una IMI en el establo L5C ($1,3 \cdot 10^6$ células por ml).

Con *S. liquefaciens*, que apareció acompañando a *S. aureus* como patógeno secundario, su presencia no supuso en sí mismo una IMI, y se detectó en el mes de febrero. El BTSCC relacionado con la muestra donde apareció ese germen fue de 900.000 cél/ml, recuento que

produjo la presencia de *S. aureus*. *H. alvei* acompañó a *S. aureus* y a diversos estreptococos lácticos, con un BTSCC de $1.1 \cdot 10^6$ células/ml y se detectó en el mes de enero. Su papel fue de patógeno secundario, ya que la mera presencia de *S. aureus* ya causó una IMI.

Las corinebacterias aparecieron en los meses de primavera (abril, mayo y junio) en ambos establos, como *Corynebacterium bovis*, *C. spp* y *Lactobacillus casei* (abril en el establo LP y junio en el LSC) o *L. spp* (junio en el establo LP).

Los cocos gram positivos se distribuyeron como sigue en ese periodo de muestreo, y en relación con el BTSCC determinado en las muestras donde se aislaron:

(*S. epidermidis* y *S. xylosus*). *S. epidermidis* fue aislado durante toda la lactación y sus 24 aislados se repartieron en ambos establos, principalmente en el LP (aproximadamente el 70% del total de casos) desde abril a diciembre-enero, y en el LSC desde mayo a julio y en el mes de octubre (2 casos). Los BTSCC medidos en el citado periodo indicaron IMI en los siguientes meses y establos: abril, julio, octubre y diciembre (en el establo LP) (en total 9 IMIs) y una media aritmética de BTSCC de $1.16 \cdot 10^6$ células/ml, junio, julio, octubre y noviembre (en el establo LSC) (en total 6 IMIs) y una media de BTSCC de $1.9 \cdot 10^6$ células/ml.

S. xylosus fue aislado durante los meses de enero y febrero y sus 5 aislados (100% del total) se localizaron solo en el establo LP. Los BTSCC registrados en las muestras indicaron 2 IMIs, con un media de recuento de 950.000 cél/ml.

Los estafilococos coagulasa positivos (*S. aureus*). Se registraron 19 aislados susceptibles de producir una IMI, observados en muestras recogidas en los meses de julio, noviembre, diciembre, enero y febrero, en ambos establos. Los BTSCC registrados correspondientes a esas muestras tuvieron una media de $1.44 \cdot 10^6$ cél/ml.

Los estreptococos contagiosos (*S. dysgalactiae*) aparecieron en 2 casos, uno en cada establo, que provocaron sendas IMIs en el mes de junio/julio, con un BTSCC correlativo de $1.32 \cdot 10^6$ cél/ml para el caso del establo LP y más de 3 millones par el del establo LSC.

Los estreptococos ambientales (enterococos, *S. bovis* y *S. acidomininus*). Los enterococos pertenecieron a 2 especies: *Enterococcus faecium* y *E. faecalis*. De *E. faecium* se registraron 14 aislados, todos ellos presentes en las muestras de los establos LP y LSC junto con otros gérmenes. Solo en 8 casos se produjo una IMI en ambos establos, en la que estuviesen implicadas estas especies, localizadas en los meses de junio, julio, noviembre y diciembre en el establo LP y julio en el LSC. En ningún caso fue el agente etiológico principal y estuvo asociado a patógenos mamíticos principales como *S. aureus* y/o *E. coli*. Los BTSCC registrados presentaron una media de $1.6 \cdot 10^6$ cél/ml. De *E. faecalis* se registraron 5 aislados, presentes en ambos establos, junto con otros gérmenes y en ningún caso tampoco fue el agente etiológico de las IMIs producidas (solo en 2 casos se pudo hablar de sintomatología clínica mamítica, el resto fueron mastitis subclínicas). Estos aislados aparecieron en los meses de junio y en todo el invierno. Los BTSCC registrados presentaron una media de $1.2 \cdot 10^6$ cél/ml.

S. bovis se localizó en 3 casos (2 en el establo LP y 1 en el LSC) asociados a otros gérmenes (estreptococos, estafilococos coagulasa negativos y *E. coli*) y en ningún caso fue el agente etiológico de una IMI (solo hubo una en el mes de octubre y localizada en el establo LSC). El BTSCC medio fue 928.000 cél/ml.

L. lactis se consideró como estreptococo transiente de la flora de los pezones de la

ubre y en ocasiones contaminó las muestras de leche. Su presencia fue abundante y se identificó en 20 aislados. De todos ellos, solo 13 contribuyeron a la aparición de una IMI en ambos establos (principalmente el LP) y se localizaron en los meses de abril, junio, julio, noviembre y diciembre en el establo LP y en junio, julio, septiembre y octubre en el LSC. El BTSCC medio registrado en vacas con IMIs fue de $1.74 \cdot 10^6$ cél/ml.

Como dato estadísticamente no significativo se registró un aislado de *S. pyogenes*, asociado con *C. bovis* y aparecido en el mes de junio en el establo LSC. El BTSCC registrado fue $2.4 \cdot 10^6$ cél/ml.

El análisis bacteriológico efectuado en muestras de leche tomadas de los cuarterones de las vacas de ambos establos, al inicio del período de muestreo, arrojó los siguientes resultados:

Los aislados pertenecían a las especies (establo LSC) *S. aureus*, *S. epidermidis*, *Corynebacterium bovis*, *Bacillus subtilis*, *Enterococcus faecium*/*E. faecalis*, *L. lactis*, *Lactobacillus spp*, *Enterobacter cloacae* y *Candida albicans*. Los porcentajes de incidencia fueron como sigue (sobre el global de vacas y por especies bacterianas, de menor a mayor incidencia): *S. aureus* (el 12.5%: 1 aislado); *Bacillus subtilis* (el 12.5%); *Lactobacillus spp* (el 12.5%); *E. cloacae* (el 12.5%); *C. albicans* (el 12.5%); *C. bovis* (el 25%); *E. faecalis*/*E. faecium* (el 25%); *S. epidermidis* y *L. lactis* (el 87.5%).

(Establo LP): *S. aureus*, *E. coli*, *S. epidermidis*, *M. luteus*, *L. lactis*, *Lactobacillus spp*, *S. xylosus*, *Enterococcus faecalis*, *Corynebacterium bovis*, *Serratia liquefaciens*, *Enterobacter sakazakii* y *Proteus mirabilis*. Los porcentajes de incidencia se valoraron de igual modo que en el otro establo: *S. xylosus* (el 8.25%: 1 aislado); *Enterococcus faecalis* (el 8.25%); *Serratia liquefaciens* (el 8.25%); *Corynebacterium bovis* (el 8.25%);

Enterobacter sakazakii (el 8.25%) y **Proteus mirabilis** (el 8.25%); **E. coli** (el 16%: 2 aislados); **S. aureus** (el 16%); **Lactobacillus spp** (el 16%); **L. lactis** y **M. luteus** (el 25%: 3 aislados); **S. epidermidis** (el 75%: 9 aislados).

Examinando el cuadro correspondiente a la hoja de cálculo 4.XLS, se observa que el n° de vacas enfermas con signos clínicos de mastitis fue mayor en el establo LSC en términos absolutos y en proporción al tamaño de la población de cada establo que en el LP y que esa mastitis fue predominante durante el verano.

Las vacas se reconocieron enfermas más por la observación clínica de la sintomatología y la determinación de los recuentos celulares que por su asociación con la presencia de patógenos mastíticos contagiosos (hubo presencia predominante de patógenos ambientales en esos casos) (excepto en el caso de *S.dysgalactiae*) (según se deduce del análisis factorial y de componentes principales, con la rotación varimax que se cita en ANEXOS).

De los datos de identificación microbiológica se deduce que, coincidiendo con lo hallado por otros investigadores, los estafilococos coagulasa negativos son los principales gérmenes hallados en IMIs subclínicas y clínicas, y que la contaminación ambiental con estreptococos y coliformes puede mediatizar las conclusiones sobre la evaluación sanitaria de un rebaño.

Cabe citar que en el establo control colaborador (el FM) se obtuvo un BTSCC medio durante el periodo de muestreo por debajo de 400.000 cél/ml, es decir, no hubo IMI y que el recuento de flora aerobia total, incluyendo los psicrótrofos, osciló entre 30.000 ufc por ml por término medio en invierno y 90.000 ufc en verano.

El cultivo microbiológico de las muestras simples consecutivas de leche tuvo

una elevada especificidad y sensibilidad, mientras que estos mismos parámetros al realizar el ELISA o al determinar el BTSCC fueron mucho menores. Los resultados mejoraban combinando los de varias muestras consecutivas, en cuanto a fiabilidad y sensibilidad. Los resultados combinados de varias muestras se usaron para clasificar los establos como con elevados o bajos SCC en un periodo dado de muestreo (i mes).

La especificidad de la respuesta detectada por ELISA en cada establo estuvo restringida a un set de diferentes cepas de *S. galactiae* que portaban proteína X. La señal fue fuerte, siendo la sensibilidad última del ensayo capaz de detectar desde 9 a 0.7 nanogramos de antígeno/ml con el antisuero diluido 1/250 hasta 1/1000, variando entre absorbancias a 405 nm con lecturas de 0.7 hasta 0.15 de densidad óptica. El coeficiente de variación intraensayo de la absorbancia de los estándares varió entre el 3 y el 10% y el rango interensayo dependió de la concentración del antígeno. Para definir el cutoff entre muestras positivas y negativas, se ensayaron homogenados de varias muestras de suero de vacas con y sin IMIs por el mismo ELISA. Los valores que indicaban concentraciones de menos de 10^5 ufc/ml de homogenado o extracto se consideraron negativos. De todas las cepas procesadas por ELISA y por cultivo microbiológico al tiempo, se obtuvo un 74% mínimo de resultados consistentes con el ELISA al comparar con el resultado del cultivo respecto al volumen total de muestras. No obstante, el resultado más sensible para el ELISA fue del 85%, observándose que la sensibilidad disminuía y aumentaba el background cuanto menor era la dilución del homogenado, y si se combinaban los resultados aumentaba la especificidad del ensayo.

DISCUSION

La principal conclusión que se obtuvo del análisis de los datos citados en la Tabla I es que tanto en un establo como en el otro los resultados del análisis microbiológico indicaron infecciones mixtas donde no existía un patógeno principal claro, correlacionándose con recuentos celulares bajos, o bien existía un agente etiológico contagioso (*S. aureus*, *S. dysgalactiae*, ...) pero el recuento era relativamente bajo (no indicaba una IMI con sintomatología clínica), o bien existían recuentos muy elevados asociados a hallazgos microbiológicos de patógenos ambientales (no contagiosos).

Este fenómeno se presentó a lo largo de todo el período de muestreo y fue independiente del estadio de lactación, la dieta, la época del año, el estado fisiológico de las vacas y otros factores ambientales. En lo referente a las vacas, aunque el muestreo fue único y al inicio del período, la incidencia de patógenos contagiosos fue baja y su prevalencia nula (solo afectaba a una vaca de un establo). Las especies bacterianas más prevalentes formaban parte de la flora de la piel de los pezones en cada vaca.

Los distintos tests diagnósticos utilizados en este estudio se compararon respecto a su capacidad para predecir el estatus de IMI del rebaño a partir de la leche del tanque en un momento dado, para cada rebaño/establo. La capacidad predictiva se evaluó a partir de los valores del análisis factorial.

Los indicadores test de IMIs se evaluaron como valores absolutos y como

índice/cociente entre muestras de tanque de cada establo y las muestras de las vacas de esos establos. El índice se usó para eliminar la variación causada por los factores no patológicos que afectaron a todas las vacas por igual.

Un punto crítico en la evaluación de los tests de selección utilizados fue como decidir sobre el estatus sanitario verdadero del rebaño de cada establo, traducido en la calidad higiénica de la leche del tanque. Aunque el aislamiento de las diversas especies bacterianas en leche no es sinónimo necesariamente de IMI y mamitis, fue el criterio aplicado en este trabajo.

Hubo una probable variación en los indicadores de mamitis dentro de cada muestra de leche clasificada como mamítica (subclínica o clínica) o no, ya que la respuesta puede ser más persistente que con la presencia real de bacterias en el momento de la toma de cada muestra. La respuesta real de las vacas y por ende el tanque a un flujo de entrada de bacterias podría diferir también debido, por ejemplo, a diferencias en la virulencia dentro de cada especie bacteriana.

Los resultados de los análisis estadísticos mostraron diferencias en la capacidad de los distintos indicadores para predecir la presencia de un patógeno contagioso. Esto parece indicar que el análisis microbiológico por sí solo es incapaz de diagnosticar una mamitis, porque el análisis factorial nos indicó que los valores umbral obtenidos respecto a los patógenos secundarios o ambientales identificados eran mucho mayores que los respectivos de los llamados patógenos principales, susceptibles de causar por sí mismo mamitis, con signos clínicos y recuentos celulares muy elevados. Las vacas deben examinarse y tener en cuenta los factores asociados a una IMI (endurecimiento de pezones, coagulación de la leche, tumefacción, rubor y calor en la glándula mamaria, ...) para complementar los resultados del BTSCC y del análisis microbiológico para emitir un diagnóstico claro de mamitis, según se

desprende de este estudio. Los indicadores se podrían combinar de varias formas dependiendo de si el propósito era incrementar la sensibilidad o la especificidad para predecir la presencia de un patógeno mamítico contagioso.

Los criterios de interpretación de los resultados del cultivo varían con la identidad del aislado. En el caso de los gérmenes oportunistas ambientales (como coliformes) el significado cultural se determina sobre la base del n° de microorganismos recogido, la pureza de la cepa, la IMI producida (en su caso) (determinada por el BTSCC) y la reproducibilidad por cultivos seriados. La identificación de 1 ufc/ml de estafilococos coagulasa positivos y *S. dysgalactiae* se consideró normalmente como evidencia presuntiva de la infección. Tales interpretaciones se relacionaron con la eventual aplicación de los resultados del cultivo. En el sentido más simplista, la sensibilidad microbiológica puede aproximarse como el producto del volumen del inóculo (en este caso 0.5 ml) y la concentración bacteriana en cada muestra. Es factible que la sensibilidad pueda potenciarse bien incrementando el volumen del inóculo o incrementando la concentración de bacterias viables recogidas en placa de cada muestra.

La recogida numérica de ufc, no obstante, no puede ser interpretada estrictamente como una medida de la sensibilidad del diagnóstico. Debido a que se le da la misma importancia al aislamiento de pocas o muchas ufc (el estudio no tuvo un enfoque cuantitativo) la identificación de las especies y las muestras infectadas presentó un resultado similar en su distribución a una curva de Poisson con sobredispersión. La positividad en el cultivo fue representativa de la mastitis clínica y/o subclínica, así como estadios variables de la progresión natural de las IMI.

Los resultados de este estudio indicaron que los estafilococos coagulasa positivos

podían aislarse repetidamente de rebaños con bajos SCC. Las posibles explicaciones para esa baja respuesta a una infección clara podrían incluir la duración de la infección, su localización, el efecto de la dilución de la leche en el tanque, el estatus inmunológico del rebaño y las probables diferencias metabólicas y de patogenicidad en las cepas aisladas de *S. aureus*.

El examen bacteriológico de las muestras de leche para cada rebaño proporcionó lecturas de recuentos de ufc con un promedio de 10^5 estreptococos ambientales y 10^5 estafilococos coagulasa negativos y coliformes, por ml de leche.

Las infecciones producidas por los patógenos primarios no fueron comunes durante el periodo de muestreo, exceptuando aquellas por *S. aureus*. La baja incidencia de la mastitis clínica tal como se deduce de los relativamente bajos SCC en la mayoría de las muestras demostró la eficacia de los programas de control de mastitis realizados en esos establos para prevenir la aparición de patógenos contagiosos. El análisis de las muestras de leche tomadas inmediatamente después del reconocimiento de una IMI clínica indicó que los principales productores de IMIs no eran los patógenos contagiosos sino más bien los ambientales, y su distribución no era al azar en el periodo de muestreo.

El mayor número de vacas con IMIs que produjeron elevados SCC en las muestras de leche de ambos establos por patógenos ambientales presentaron una acusada querencia estacional a la infección en los meses de verano. Este incremento de la infección apareció retrasado si era provocado por estreptococos ambientales respecto al ocasionado por coliformes (pudo detectarse una infección persistente por *E. coli* en el establo LP mediante un muestreo repetido de la leche) (no obstante, el índice y la duración de las infecciones naturales por ese patógeno difirieron a medida que evolucionaba el estatus funcional de las ubres de las vacas en ambos rebaños, del estadio de lactación al de secado (la susceptibilidad a los

podían aislarse repetidamente de rebaños con bajos SCC. Las posibles explicaciones para esa baja respuesta a una infección clara podrían incluir la duración de la infección, su localización, el efecto de la dilución de la leche en el tanque, el estatus inmunológico del rebaño y las probables diferencias metabólicas y de patogenicidad en las cepas aisladas de *S. aureus*.

El examen bacteriológico de las muestras de leche para cada rebaño proporcionó lecturas de recuentos de ufc con un promedio de 10^3 estreptococos ambientales y 10^5 estafilococos coagulasa negativos y coliformes, por ml de leche.

Las infecciones producidas por los patógenos primarios no fueron comunes durante el periodo de muestreo, exceptuando aquellas por *S. aureus*. La baja incidencia de la mastitis clínica así como se deduce de los relativamente bajos SCC en la mayoría de las muestras demostró la eficacia de los programas de control de mastitis realizados en esos establos para prevenir la aparición de patógenos contagiosos. El análisis de las muestras de leche tomadas inmediatamente después del reconocimiento de una IMI clínica indicó que los principales productores de IMIs no eran los patógenos contagiosos sino más bien los ambientales, y su distribución no era al azar en el periodo de muestreo.

El mayor número de vacas con IMIs que produjeron elevados SCC en las muestras de leche de ambos establos por patógenos ambientales presentaron una acusada querencia estacional a la infección en los meses de verano. Este incremento de la infección apareció retrasado si era provocado por estreptococos ambientales respecto al ocasionado por coliformes (pudo detectarse una infección persistente por *E. coli* en el establo LP mediante un muestreo repetido de la leche) (no obstante, el índice y la duración de las infecciones naturales por ese patógeno difirieron a medida que evolucionaba el estatus funcional de las ubres de las vacas en ambos rebaños, del estadio de lactación al de secado (la susceptibilidad a los

En el presente estudio, el API STAPH identificó correctamente todos los *S. aureus* aislados y todos los estafilococos coagulasa negativos (*S. epidermidis* y *S. xylosus*) aunque hubo dificultades en algunos aislados debido a su variabilidad fenotípica expresada en los perfiles numéricos obtenidos, como ya se señaló en el apartado de RESULTADOS. No hubo reactividad cruzada entre los estafilococos coagulasa negativos que influyese en su identificación. Como no se identificaron cepas de *S. warneri* y *S. hominis*, no se pudo confirmar la baja eficacia del sistema en su caracterización, tal como sucedió con el STAPH-ZYM.

El sistema API STAPH utilizado tuvo mayor fiabilidad que los sistemas STAPH-TRAC y STAPH-IDENT, comparando los resultados de identificación obtenidos en este estudio y los citados por Watts y Nickerson en 1986, ya que los porcentajes de identificación de estafilococos fueron del 100% comparándolos con sus resultados obtenidos con el STAPH-TRAC. Además no fueron necesarios tests bioquímicos suplementarios.

Los resultados obtenidos por Watts en 1989 con el RAPID STREP SYSTEM (equivalente al API 20 STREP) indicaban un porcentaje de identificación correcta de los estreptococos ambientales del 63% en una primera lectura (a las 4 horas) y del 83% (a las 24 horas) y sin llegar al nivel de especie. Sin embargo, en este estudio, todos los aislados, excepto tres, fueron identificados a nivel de especie como *Enterococcus faecium*/*E. faecalis*, *S. bovis*,... y la confirmación bioquímica se produjo a las 24 horas de incubación de la galería API.

En lo referente a los bacilos Gram negativos, los coliformes fueron identificados con el API 20E con un 100% de eficacia a las 24 horas de incubación, al igual que en el estudio de Todhunter et al (1990) pero a diferencia de éste, aquí la distribución de coliformes fue muy

distinta, siendo fundamentalmente aislados de *E. coli*, y no se detectaron durante el invierno sino predominantemente en verano y otoño.

La incidencia de *E. coli* estuvo correlacionada con la dieta, la edad de las vacas y la transición fisiológica del período de lactación al de secado en ambos establos. *E. coli* no fue aislada de la línea de ordeño, los materiales del establo, etc., con lo que su papel como patógeno ambiental no se vio reforzado respecto a lo citado en la literatura. No hubo desplazamiento de su importancia en las IMIs por otros coliformes como *Klebsiella* y *Enterobacter*. El hecho de que se encontrase en cultivo puro en la leche (no con otros coliformes) con elevados SCC se debió a su más rápido índice de crecimiento, con lo cual aprovechó mejor el substrato que sus competidores, potenciando su infectividad en la leche.

El significado epidemiológico de su persistencia en el tanque de mezcla de cada establo a lo largo del verano y el otoño es desconocido, a la luz de los hallazgos obtenidos y el origen de la infección. No siempre el SCC fue elevado, acompañando a su aislamiento en leche.

En cuanto al aislamiento de corinebacterias (gnos. *Lactobacillus* y *Corynebacterium*) se produjo en primavera (abril y junio) cuando hubo una transición fisiológica de las ubres de las vacas de ambos establos muestreados. La inhibición del crecimiento en las secreciones recogidas durante ese período podría estar asociada con el elevado índice de eliminación espontánea de la IMI por *Corynebacterium* desde el cese del ordeño al parto, cuando las vacas se van secando. Las razones para ese elevado índice de eliminación espontánea son específicamente desconocidas (Oliver and Juneja, 1990). Por el contrario, la IMI por *C. bovis* durante la lactación puede persistir debido a que la leche proporciona un excelente medio para el crecimiento, y lo que explicaría las diferencias significativas en el crecimiento de *C. bovis* en secreciones de vacas individualizadas.

Siendo como es *C. bovis* un patógeno menor, en las muestras donde se aisló no se registraron SCC elevados sino que estaban asociados en infecciones mixtas con un patógeno mamítico mayor, de lo cual se deduce que no parece que esa bacteria pudiese producir protección frente a varios patógenos mamíticos por sí misma, tal como se comentaba en la literatura.

El aislamiento de enterobacterias como *Aeromonas* se debió probablemente a una contaminación del agua de bebida de las vacas, al igual que el aislado de *S. pyogenes* procedería de una fuente humana transmitida a través del aire y los materiales de ordeño a la ubre.

La prevalencia de los patógenos mayores se incrementó con el n° de lactaciones. Esto pudo deberse a la acumulación de IMIs pero también a un aumento de la sensibilidad de ambos rebaños a las infecciones. Las que produjeron los coliformes fueron en general de corta duración (menos de 30 días) pero se repitieron sistemáticamente durante el verano y el otoño, probablemente causadas por la misma cepa (por lo menos para *E. coli*), e incluso el mismo ecovar.

Las IMIs por estreptococos ambientales fueron de duración similar, y no se solaparon con las derivadas de coliformes, puesto que raramente se encontraron infecciones mixtas con hallazgos en ambos establos de *E. coli* y enterococos simultáneamente.

El BTSCC fue el otro indicador de mamitis utilizado comparativamente con el análisis microbiológico, tal como se señala en la Tabla 1.

La asunción básica relativa al BTSCC fue que los valores variaron entre una media localmente constante en períodos con un manejo y un estatus sanitario estables en el rebaño. En otros períodos, los valores de BTSCC pudieron inclinarse gradualmente hacia un nuevo

nivel, pero en algunos casos deterioros o mejoras abruptas en el manejo del rebaño o su salud pudieron derivar en cambios bruscos de nivel de BTSCC.

Las variaciones pueden deberse a factores ambientales y/o bacterianos. Así, puede mejorarse la interpretación del SCC si se tienen en cuenta las causas no bacterianas de variación. En la literatura se cita que aparte del estatus bacteriano, factores tales como cambios diurnos, oscilaciones en el rendimiento lechero diario, el estadio de lactación y la variación día-día afectan los BTSCC, incrementándose las medias con el n° de lactaciones.

En el presente estudio se pretendió cuantificar la influencia de los factores bacterianos sobre el BTSCC y estudiar en que sentido se ve afectada la estabilidad de la infección por la variación en el BTSCC asociada a un/os aislado/s bacteriano/s dados y cuantificar también en que medida los factores no bacterianos pudieron influir en la interpretación diagnóstica de los BTSCC.

Los resultados obtenidos indicaron que la clase bacteriológica era la fuente más importante de variación, y la clasificación de los datos bacteriológicos expresaba la detección de los diferentes aislados dentro de cada tanque/establo y por periodo de lactación. No se consideró la secuencia en la cual aparecieron los distintos aislados. Sobre la base de los datos analizados, fue importante considerar la localización del germen/es en las ubres de las vacas en caso de una IMI.

Hubo grandes diferencias en los BTSCC entre cada grupo de especies bacterianas (Tabla 1). Lo más frecuente era que recuentos elevados se correlacionasen con hatazgos de cepas de patógenos principales. Varios factores podrían contribuir a las relaciones observadas:

1) Un elevado índice de aislados en una muestra de leche concreta incrementó el riesgo de que uno de los aislados fuese un falso negativo/positivo y un elevado déficit de aislados en

el cultivo incrementó la probabilidad de que un aislado concreto fuese fruto de una contaminación y en realidad el cultivo fuese negativo.

2) La localización del microorganismo dentro del rebaño (partiendo de que todas las vacas fueron ordeñadas y aportaron leche al tanque donde se tomó la muestra semanal) afectó al BTSCC (debido a que la capacidad de inmunestimulación de PMN y macrófagos para su migración a la leche no era la misma si el patógeno en cuestión era un parásito intramamario (como algunos estreptococos) o era un patógeno ambiental presente en la piel del pezón o en la entrada del canal del pezón (coliformes, estafilococos coagulasa negativos, enterococos) y por ello su probabilidad de eliminación por efecto dilución en el ordeño o con las prácticas de manejo pre-ordeño era distinta.

3) Muchas cepas virulentas de una especie dada causan IMIs con síntomas severos de infiltración en los tejidos mamarios (caso de *S. dysgalactiae* y *S. aureus*) respecto a otros gérmenes y provocan por lo tanto diferente respuesta inmunitaria y por ende recuentos celulares diversos.

4) Las vacas con IMIs resultaron más sensibles a la infección por patógenos ambientales, lo que supuso recuentos elevados asociados a patógenos menores en algunos casos.

Uno de los establos chequeados, el LSC, tuvo BTSCC mucho más elevadas y de forma consecutiva durante los meses de verano y no siempre provocadas por la presencia de *S. aureus*, por ejemplo. Se desconoce si ello se debió a factores de manejo o por una mamitis estacional que no fue adecuadamente tratada con antibioterapia, manteniéndose con BTSCC

elevados hasta que se produjo una eliminación espontánea y los recuentos cayeron hasta valores relativamente normales. Las muestras positivas a patógenos mayores llegaron a tener BTSCC medios de hasta 8 veces los recuentos en muestras negativas.

De los resultados obtenidos se puede concluir que hubo un incremento sistemático en el nivel base de BTSCC con el avance del verano y el otoño, en uno de los establos, y que el incremento fue aproximadamente de la misma magnitud para todos los patógenos ambientales.

El estudio presente muestra un claro efecto de la presencia de patógenos, la edad de las vacas, el estadio de lactación y la época del año sobre el BTSCC.

Las variaciones dentro de los rangos de ausencia de mastitis en SCC (por debajo de 400.000 cél/ml) se clasificó sobre la base de datos bacteriológicos y no estuvo relacionada con la función de la glándula mamaria. Esto puede justificarse por el hecho de que la gran mayoría de los casos de mastitis derivan de infecciones, con SCC reales elevados.

La proporción de muestras de leche con un aislado bacteriano igual o excediendo los umbrales relativos de positividad/negatividad de IMIs se basó en el nº de UFC/ml que se detectó cada vez. Además, el uso de umbrales variables no permitió la detección de IMIs asintomáticas que supusiesen una mastitis subclínica y con bajo SCCs. Así, se subestimaría la prevalencia de las mastitis subclínicas, en las vacas en primera lactación sobre todo. En este estudio, se obtuvieron BTSCC con valores por debajo de los umbrales relativos y sin embargo se obtuvieron aislados de patógenos mastíticos ambientales, sobre todo presentes en casos de mastitis subclínica (como *S. epidermidis*). Es decir, las diferencias en el estatus bacteriano son la causa más importante de variación en el BTSCC y el criterio más exacto para interpretar la posible presencia de una IML.

En general, la determinación de los BTSCC fue un test mejor para detectar IMIs que

lo fue el ELISA, aún en el caso específico al que se aplicó éste.

En este trabajo, se describió el uso de un ELISA para detectar *S. agalactiae* en extractos/homogenados procedentes de suero de vacas con IMIs, previamente detectados por análisis microbiológicos asociados a BTSCC, teniendo en cuenta la buena respuesta de los anticuerpos frente a la proteína X, presuntamente responsable de la virulencia de esa bacteria en mamitis. Paralelamente al test diseñado para *S. agalactiae*, se valoraron los resultados del ELISA para *S. aureus* (comercializado como ProStaph), que ya fue utilizado por Grove y Jones, en 1991, para hacer un screening de las IMIs provocadas por *S. aureus*, con un promedio de especificidad del 96% al predecir el estatus de IMI y una sensibilidad del 90% para detectar vacas infectadas. Los resultados han confirmado la sensibilidad y especificidad del ProStaph.

Los resultados obtenidos con el análisis microbiológico y el BTSCC de cada muestra de leche han conducido a concluir que el valor test positivo para ELISA era muy bajo respecto al valor obtenido con los ensayos de diagnóstico clásico anticipados (tal como encontraron Hicks et al en 1990 y 1994) y por lo tanto no proporcionaba sino una información adicional de selección rápida complementado con los otros tests. Los mejores resultados del ELISA se correspondían con el estatus de IMI provocadas por cepas tipo de *S. agalactiae*, que producían muy elevados BTSCC pero en el caso de cepas nativas no hubo correlación clara con un resultado positivo fuerte del ELISA. De cualquier modo, se eliminaron los posibles falsos positivos del test mediante el uso de placas microtiter control tapizadas con inmunoglobulina bovina no sensibilizada (Sigma, MO) frente al antígeno (proteína X) y no cubiertas con WGA en ELISAs paralelos y se vió que su importancia estadística dependía tanto de la dilución final del homogenado que contenía los antígenos bacterianos como de la

adsorción inespecífica por efecto camuflaje con otras proteínas séricas residuales que ocupaban aparentemente epítopos de la inmunoglobulina bovina combinada por atracción de la WGA y por ello no permitían la unión de los antígenos de *S. agalactiae* con ella. La aplicación de estos ELISA empleando reactivos estables previamente optimizados, los bajos valores de background obtenidos y la fuerte y específica combinación entre el conjugado y el complejo enzima-sustrato hicieron este método fácilmente reproducible.

CONCLUSIONES

1. El análisis multivariante de factores sugiere que únicamente el recuento de células somáticas totales (CELT) y células somáticas pico (CELP), junto con la presencia de *Streptococcus dysgalactiae* en la leche, estuvieron asociados a la aparición de enfermedad por mastitis en las vacas de los establos muestreados. El resto de los patógenos contagiosos identificados en las muestras no deben ser utilizado como indicador de indicio de IMIs, a diferencia de lo que se indica en la literatura, y de acuerdo con el análisis estadístico realizado en este estudio.
2. El BTSCC constituyó un método eficaz en la monitorización de la salud del rebaño respecto a la mastitis, permitiendo una detección precoz de IMIs.
3. Cuando el análisis de factores se realiza teniendo en cuenta todos los microorganismos aislados patógenos contagiosos y ambientales, cada factor se saturó únicamente con microorganismos contagiosos o con microorganismos ambientales; en ningún caso se produjo mezcla. Esto sugiere que las fluctuaciones de los microorganismos contagiosos eran independientes de las de los microorganismos ambientales.

AGRADECIMIENTOS

El autor desea expresar su más sincera gratitud al profesor Dr. JAIME FABREGAS CASAL, al D. EUGENIO REY FERNANDEZ, al director del CIAM durante el desarrollo del protocolo de trabajo (D. CARLOS DANS GARATE), por facilitar el uso de las instalaciones del Centro para esta tesis, así como a diversos investigadores del CIAM por sus consejos y apoyo técnico.

Asimismo agradece la ayuda para la obtención de las muestras que constituyeron la base para este estudio por parte de los propietarios de los establos muestreados y al director gerente del LIGAL por el procesamiento desinteresado de las muestras que fueron analizadas químicamente.

También agradece el apoyo financiero del Ministerio de Educación y Ciencia a través de la concesión de una beca de perfeccionamiento de personal investigador en 1994.

ANEXOS:**Tablas 1,2 y 3****Figuras 1,2 y 3****Análisis estadístico: tablas****Hojas de cálculo 2.xls, 3.xls y 4.xls**

BIBLIOGRAFIA

1. Adams, D.S.; Hancock, D.; Fox, L. and McDonald, J.S. (1992) Frequency of reisolation of *S. aureus* from multiple sequential milk samples. *Journal of American Veterinary Medical Association*, nº 201:4 pp:575-579.
2. Adkinson, R.W.; Ingawa, K.H.; Blonin, D.C. and Nickerson, S.C. (1993) Distribution of clinical mastitis among quarters of the bovine udder. *Journal of Dairy Science*, 76: 3453-3459.
3. Almeida, R.A.; Calvino, L.P.; Quaino, G.R.; Canavesio, V.de (1991). Correlación entre el Wisconsin Mastitis Test y el recuento microscópico directo en la leche de mezcla. *Revista de Medicina Veterinaria-Buenos Aires*, 72:2, 94-96.
4. Anderson, K.L. (1988) El control de la mastitis por coliformes en la vaca lechera. *Therios*, 12:60, 374-381.
5. Anderson, K.L.; Wesen, D.P. and Fetrow, J. (1991) Influence of inoculum volumen in diagnosis of environmental mastitis from clinical quarters. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 3:2, 165-167.
6. Anderson, K.L.; Smith, L.A.; De Graves, F.J. and Hunt, E. (1992) PMN leukocyte function in clinical bovine patient and in cows with or without *S. aureus* mastitis. *Veterinary Research Communications*, 16:2 107-115.
7. Anderson, K.L. and Hunt, E. (1993) Update on bovine mastitis. *Veterinary Clinics of North America. Food Animal Practice*, 9:3 195 pp
8. Aoki, Y.; Notsuki, I. and Ichiwaka, T. (1992) Variation in patterns of mastitis indicators during milking in relation to infectious status. *Animal Science and Technology*, 63:7 728-735.

9. **Badinand, F. (1994)** Control of cell count in milk. *Recueil de Medicine Veterinaire*, **170**:6-7 419-427.
10. **Ball, H.J. et al (1991)** Application of a Mab-based ELISA for detection of an inflammatory response antigen in subclinical mastitis samples. *J. of Clinical Microbiology*, **29**:8 1265-1268.
11. **Ball, H. J. ; Greer, D. ; Finlay, D. and Mackie, D.P. (1991)** Examination of milk samples from experimentally infected heifers by an NAGase test and an antigen-capture-ELISA. *Research in Veterinary Science*, **51**:3 299-305.
12. **Barber, A.; Reneau, J.K. and Steurnagel, G.R. (1992)** Herd average ProStaph as a measure of herd *S. aureus* level. *Journal of Dairy Science*, **75**: supplement 1, 188.
13. **Barber, A.; Reneau, J.K. and Fansworth, R.J. (1992)** Monthly DHI ProStaph testing combined with bulk tank culturing and individual SCC data as a tool in characterizing herd environmental mastitis. *Journal of Dairy Science*, **75**: suppl. 1, 189.
14. **Barnouin, J.; Fayet, J.C.; Jay, M. et Brochart, M. (1986)** Continuous eco-pathological survey: mastitis risk factors in dairy cows. I. Multidimensional analysis of herd data. *Canadian Veterinary Journal*, **27**:3 135-145. II. Complementary analyses of individual and herd data. *Canadian Veterinary Journal*, **27**:4 173-184.
15. **Bartlett, P.C.; Miller, G.Y.; Lance, S.C. and Heider, L.L. (1992)** Managerial determinants of intramammary coliform and environmental streptococci infections in Ohio dairy herds. *Journal of Dairy Science*, **75**:5 1241-1252.
16. **Barlett, P.C. et al (1992)** Environmental and managerial determinants of SCC and clinic mastitis incidence in Ohio dairy herds. *Preventive Veterinary Medicine*, **14**: 3-4, 195-207.

17. **Batra, T.R. and McAllister, A.J. (1984)** A comparison of mastitis detection methods in dairy cattle. *Canadian Journal of Animal Science*, **64**:2 305-312.
18. **Bazin, S. (1983)** An improved approach to bovine mastitis problem. II. Incidence and bacteriology of clinical cases, plan of prevention, approach to the problem on the farm. *Bulletin Mensuel de la Societe Veterinaire Pratique de France*, **67**:3 159..180.
19. **Berning, L.M.; Shook, G.E. and Pinheiro, J. (1993)** An optimal transformation for milk NAGase activity. *Preventive Veterinary Medicine*, **17**:77-88.
20. **Berthelot, X. et Espinasse, J. (1991)** From epidemiological diagnosis of mastitis to global diagnosis of milk quality. *Mammites des vaches laitières, Paris*, 6-16.
21. **Bertoldini, G.; Brunner, F. and Nai, P. (1984)** Rapid identification of *S. agalactiae* by the CAMP test and a coagglutination method. *Archivio-Veterinario-Italiano*, **35**:2, 101-103.
22. **Booth, J.M. (1985)** Bulk milk somatic cell counting: methods in use and a proposal for the standard presentation of data.
23. **Bramley, A.J. (1984)** *S. uberis* udder infection - a major barrier to reducing mastitis incidence. *British Veterinary Journal*, **140**:4 328-335.
24. **Brolund, L. (1985)** Cell counts in bovine milk, causes of variation and applicability for diagnosis of subclinical mastitis. *Acta Veterinaria Scandinavica*, supplement 80, 123 pp.
25. **Brolund, L. (1985)** Individual cow cell counting: diagnostic significance and applicability. *Kieler Milchwirtschaftliche Forschungsherrichte*, **37**:3 286-297.
26. **Casado-Cimiano, P.; Pena-Herrería, J.; García Alvarez, J.A. y Villar-García, A. (1988)** El recuento de células somáticas a nivel de leche de mezcla del rebaño lechero en Cantabria. *Revista Española de Lechería*, nº 4, 25-26.

27. **Centorbi, O.N.P. de (1992)** Prevalencia de *S. aureus* aislado de mastitis bovina subclínica en las granjas lecheras de la ciudad de San Luis. *Revista Argentina de Microbiología*, **24:2** 73-80.
28. **Coffey, E.M.; Vinson, W.E. and Pearson, R.E. (1986)** Somatic cell counts and infection rates for cows of varying somatic cell count in initial test of first lactation. *Journal of Dairy Science*, **69:2** 552-555.
29. **Corbellini, C.N. et al (1987)** Relación entre la concentración de NAGasa en leche y el estado de infección de los cuarterones de la ubre. *Revista Medicina Veterinaria Argentina*, **68:3** 132-140.
30. **Corbellini, C.N.; Dupuy, M.; Cascagno, C.; Callieri, C.; Wainmaier, M. y Godoy, J. (1987)** La determinación de sodio y potasio en leche y su relación con la concentración de células somáticas y su uso en la monitorización de mastitis subclínica. *Bulletin de la IDF*, **177** pág. 169.
31. **Chamrings, R.J. (1984)** Effect of different methods of udder preparation on the somatic cell count and bacterial count of herd bulk milk. *Journal of the Society of Dairy Technology*, **37:4**, 130-132.
32. **Daniel, R.C.W and Barnum, D.A. (1986)** Preliminary observations on the use of latex agglutination test for the detection of mastitis due to *S. agalactiae* in cows. *Canadian Journal of Veterinary Research*, **50:1** 133-135.
33. **Dargent-Molina, D. (1988)** Herd-level risk factors for *S. aureus* and *S. agalactiae* IMIs. *Preventive Veterinary Medicine*, **6:2** 127-142.
34. **Deluyker, H.A.; Gay, J.M. and Weaver, L.D. (1993)** Interrelationships of somatic cell count, mastitis and milk yield in a low somatic cell count herd. *Journal of Dairy Science*, **76:11** 3445-3452.

27. **Centorbi, O.N.P. de (1992)** Prevalencia de *S. aureus* aislado de mastitis bovina subclínica en las granjas lecheras de la ciudad de San Luis. *Revista Argentina de Microbiología*, **24**:2 73-80.
28. **Coffey, E.M.; Vinson, W.E. and Pearson, R.E. (1986)** Somatic cell counts and infection rates for cows of varying somatic cell count in initial test of first lactation. *Journal of Dairy Science*, **69**:2 552-555
29. **Corbellini, C.N. et al (1987)** Relación entre la concentración de NAGasa en leche y el estado de infección de los cuarterones de la ubre *Revista Medicina Veterinaria Argentina*, **68**:3 132-140
30. **Corbellini, C.N.; Dupuy, M.; Carcagno, C.; Callieri, C.; Wainmaier, M. y Godoy, J. (1987)** La determinación de sodio y potasio en leche y su relación con la concentración de células somáticas y su uso en la monitorización de mastitis subclínica *Bulletin de la IDF*, **177** pág. 169.
31. **Chammings, R.J. (1984)** Effect of different methods of udder preparation on the somatic cell count and bacterial count of herd bulk milk. *Journal of the Society of Dairy Technology*, **37** 4, 130-132.
32. **Daniel, R.C.W and Barnum, D.A. (1986)** Preliminary observations on the use of latex agglutination test for the detection of mastitis due to *S. agalactiae* in cows. *Canadian Journal of Veterinary Research*, **50**:1 133-135
33. **Dargent-Molina, D. (1988)** Herd-level risk factors for *S. aureus* and *S. agalactiae* IMIs. *Preventive Veterinary Medicine*, **6**:2 127-142.
34. **Deluyker, H.A.; Gay, J.M. and Weaver, L.D. (1993)** Interrelationships of somatic cell count, mastitis and milk yield in a low somatic cell count herd. *Journal of Dairy Science*, **76**:11 3445-3452.

35. Devriese, L.A. (1991) Streptococcal ecovars associated with different animal species: epidemiological significance of serogroups and biotypes. *Journal of Applied Bacteriology*, 71: 478-483.
36. Devriese, L.A. (1994) A simple identification scheme for coagulase negative staphylococci from bovine mastitis. *Research in Veterinary Science*, 57:2 240-244.
37. Dinsmore, R.P.; English, P.B.; González, R.N.; Sears, P.M. and Schulte, H.F. (1991) Evaluation of methods for the diagnosis of *S. agalactiae* IMis in dairy cattle. *Journal of Dairy Science*, 74:5 1521-1526.
38. Dinsmore, R.P.; English, P.B.; González, R.N. and Sears, P.M. (1992) Use of augmented cultural techniques in the diagnosis of the bacterial cause of clinical bovine mastitis. *Journal of Dairy Science*, 75:10 2706-2712.
39. Dodd, F.H. (1987) Bovine mastitis. Definition and guidelines for diagnosis. *Bulletin de la IDF*, n° 211, 24 pp.
40. Dohgo, I.R. (1993) An evaluation of the validity of individual cow somatic cell count from cows in early lactation. *Preventive Veterinary Medicine*, 16:2 103-110.
41. Donald, A.W. (1994) Estimating the prevalence of mastitis and other organ-specific diseases in the presence of within-animal disease correlation and diagnostic test correlation. *Preventive Veterinary Medicine*, 20:1-2 113-133.
42. Eberhart, R.J. et al (1988) Incidence and types of clinical mastitis in dairy herds with high and low somatic cell counts. *Journal of Amer. Veterinary Medical Association*, 192:5 761-765.
43. El-Rasheedy, A.A. (1988) Evaluation of mastitis screening tests in diagnosis of subclinical cases compared with the conventional bacteriological method. *Veter. Med. Journal*, 36:1 91-100.

44. Emanuelson, V.; Olson, T.; Holmberg, O.; Hageltem, M.; Mattila, T.; Nelson, L. and Aström, G. (1987) Comparison of some screening tests for detecting mastitis. *Journal of Dairy Science*, 70: 880-887.
45. Emanuelson, U. and Wever, P. (1989) Potential of differential somatic cell counts as indicators of mastitis in quarter milk samples from dairy cows. *Acta Veterinaria Scandinavica*, 30:4 475-481.
46. Erskine, R.J. and Eberhart, R.J. (1988) Comparison of duplicate and single quarter milk samples for the identification of IMIs. *J. of Dairy Science*, 71:3 854-856.
47. Fagliari, J.J. (1983) Mamite bovina: comparação de la CMT e del exame bacteriológico. *Arquivo brasileiro de Medicina Veterinaria e Zootenia*, 35:3 309-315.
48. Fandrejewska, M. (1993) Somatic cell count in quarter foremilk of cows from small herds with a high level of subclinical mastitis. *Journal of Animal and Food Science*, 2:1-2 15-26.
49. Fang, W.H.; Shi, M.H.; Huang, L.Q.; Shao, Q.J. and Chen, J. (1993) Growth of lactobacilli, *S. aureus* and *E. coli* in normal and mastitic milk and whey. *Veterinary Microbiology*, 37:1/2, 115-125.
50. Fansworth, R.J. (1993) Microbiologic examination of bulk tank milk. *Veterinary Clinics of North America, Food Animal Practice*, 9:3 469-474.
51. Faria, J.E. de (1982) Frequency of pathogens on the skin of bovine teats and in the teat canal. *Revista CERES*, 29:163 321-326.
52. Farver, T.B. (1987) Disease prevalence estimation in animal populations using two-stage sampling designs. *Preventive Veterinary Medicine*, 5:1 1-20.

53. Fenlon, D.R.; Logue, D.N.; Gunn, J. and Wilson, J. (1995) A study of mastitis bacteria and herd management practices to identify their relationship to high somatic cell count in bulk tank milk. *British Veterinary Journal*, 151: 17-25.
54. Erasmus, J.A. (1987) Some features of coagulase positive staphylococci from bovine milk. II. Comparison of conventional techniques and the API Staph system. *Onderstepoort Journal of Veterinary Research*, 54:2 159-160.
55. Firat, M.Z. (1993) An investigation into the effects of clinical mastitis on milk yield in dairy cows. *Livestock Production Science*, 36: 311-321.
56. Fox, L.K.; Shook, G.E. and Schultz, I.H. (1985) Factors related to milk loss in quarters with low somatic cell counts. *Journal of Dairy Science*, 68:8 2100-2107.
57. Fox, L.K.; Gay, J.M. and El-Rashidy, A.A. (1992) Specificity and sensitivity in diagnosis of *S. aureus* IMI by measurement of antibody titer. *J. of Dairy Science*, 75: sup.1, page 259.
58. Francis, P.G. (1991) Role of anaerobic bacteria in mastitis. *Veterinary Record*, 128:7 166-167
59. García-López, M.L. et al (1990) Biovars of coagulase-positive staphylococci isolated from bovine mastitis milk. *Microbiología*, 6(1): 31-36.
60. Gay, J.M. (1993) Epidemiology of coliform mastitis: an overview. *Proceedings of the 1993 coliform mastitis Symposium*, 10-15.
61. Gershman, M. (1988) Phage typing set for differentiating *S. epidermidis*. *Canadian Journal of Microbiology*, 34:12 1358-1361.
62. Godkin, M.A. (1990) The relationship between bulk tank milk culture results, management factor in mastitis control and the herd prevalence of mastitis. *Dissertation Abstracts International. Series B, Sciences and Engineering*, 50:12 5501-B.

63. Godkin, M.A. and Leslie, K.E. (1993) Culture of bulk tank milk as a mastitis screening test: a brief review. *Canadian Veterinary Journal*, 34:10 601-605.
64. Goldberg, J.J.; Wildman, E.E.; Pankzy, J.W.; Kunsel, J.R.; Howard, D.B. and Murphy, R.M. (1992) The influence of intensively managerial rotational grazing, traditional continuous grazing, and confinement housing on bulk tank milk quality and udder health. *Journal of Dairy Science*, 75:1 96-104.
65. Gonzalez, T.N. (1990) Epidemiology of human G streptococci (*S. dysgalactiae*) mastitis in dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 73: supplement 1, 187.
66. González, T.N. et al (1988) Prevalence of udder infections and mastitis in 50 California dairy herds. *Journal of American Veterinary Medical Associat.* 193:3 323-328.
67. Goodger, W.J.; Farver, T.; Pelletier, J.; Johnson, P.; De Suayer, G. and Galland, J. (1993) The association of milking management practices with bulk tank somatic cell count. *Preventive Veterinary Medicine*, 15:4 235-241.
68. Grindai, R.J. (1988) Update on mastitis. II. The role of the milking machine in mastitis. *British Veterinary Journal*, 144:6 524-533.
69. Grove, T.M. and Jones, G.M. (1989) The *S. aureus* milk antibody test. *Journal of Dairy Science*, 72: supplement 1 page 598.
70. Grove, T.M. and Jones, G.M. (1992) Use of an ELISA to monitor the control of *S. aureus* mastitis. *Journal of Dairy Science*, 75:2 423-434.
71. Guidry, A.J. (1985) Mastitis and the immune system of mammary gland. *Lactation*, 229-262.

72. Guidry, A.J.; Paape, M.J.; Squiggins, K.E.; Worken, M.; Hambleton, C.N. and Miller, R.H. (1992) Monoclonal antibodies to subpopulations of bovine neutrophils. *Comparative Haematology International*, n° 2: 18-23.
73. Hamana, K. (1988) Etiología, naturaleza y prevención de la mastitis de las novillas. *Medicina Veterinaria*, 5:10 487-494.
74. Harland, N.M.; Leigh, J.A. and Collins, M.D. (1993) Development of gene probes for the specific identification of *S. uberis*. *J. of Applied Bacteriology*, 74:526-531
75. Harmon, R.J. (1994) Physiology of mastitis and factors affecting somatic cell counts. *Journal of Dairy Science*, 77:7 2103-2112.
76. Harvey, J. (1985) Application of current methods for isolation and identification of staphylococci in raw bovine milk. *J. of Applied Bacteriology*, 59:3 207-221.
77. Heblet, K.H.; Ražej, J.S. et Pritchard, D.E. (1988) Coagulase positive staphylococcal mastitis in a herd with low somatic cell counts. *Journal of American Veterinary Medical Association*, 192:6 777-780.
78. Hicks, C.R.; Eberhart, R.J. and Sisco, W.M. (1994) Comparison of microbiologic culture, an ELISA and determination of somatic cell count for diagnosing *S. aureus* mastitis in dairy cows. *J. of Amer. Vet. Med. Ass.* 204:2 255-260
79. Hill, A.W. and Leigh, J.A. (1989) DNA fingerprinting of *S. uberis*: an useful tool for epidemiology of bovine mastitis. *Epidem. and Infection*, 103:1 165-171.
80. Hillerton, J.E. (1987) The epidemiology of summer mastitis: a survey of clinical cases. *British Veterinary Journal*, 43:6 520-530.

81. Hogan, J.S. and Pankey, J.W. (1985) Use of trypticase blood aesculin agar in bulk tank milk analysis. *Journal of Dairy Science*, 68: suppl. 1, 205-206.
82. Hogan, J.S.; White, D.G. and Pankey, J.W. (1987) Effects of teat dipping on IMIs by staphylococci other than *S. aureus*. *J. of Dairy Science*, 70: 875-879.
83. Hogan, J.S.; Hoblet, K.H.; Smith, K.L.; Todhunter, D.A. and Schoenberger, P.S. (1988) Factors associated with bulk tank milk counts. *Journal of Dairy Science*, 71: sup. 1 page 260.
84. Hogan, J.S.; Todhunter, D.A.; Smith, K.L. and Schoenberger, P.S. (1989) Serum susceptibility of coliforms isolated from bovine IMIs. *Journal of Dairy Science*, 72: 1893-1899.
85. Hogan, J.S.; Todhunter, D.A.; Smith, K.L. and Schoenberger, P.S. (1990) Haemagglutination and hemolysis by *E. coli* isolated from bovine IMIs. *Journal of Dairy Science*, 73: 3126-3131.
86. Holm, S.E. and Håkansson, S. (1988) A simple and sensitive EIA for determination of soluble type specific polysaccharide from group B streptococci. *Journal of Immunological Methods*, 106, 89-94.
87. Huecton, W.D. (1996) Epidemiological considerations in reporting herd somatic cell counts. *Journal of Dairy Science*, 69:7 1987-1995.
88. Hutton, C.T.; Fox, L.K. and Hancock, D.D. (1990) Mastitis control practices: differences between herds with high and low milk somatic cell counts. *J. of Dairy Science*, 73: 1135-1143.
89. Hutton, C.T.; Fox, L.K. and Hancock, D.D. (1991) Risk factors associated with herd group milk somatic cell count and prevalence of coagulase positive staphylococci IMIs. *Preventive Veterinary Medicine*, 11, 25-35.

90. Ichikawa et al. (1993) Variation of the results of bacterial culturing and indirect diagnostic methods for *S. aureus* infected udder over a two month period. *Animal Science and Technology*, 64:5 462-469.
91. Jaartsveld, F.H.J.; Puffelen, E. van de; Oskam, J. and Tielen, M.J.M. (1983) Somatic cell counts in milk of dairy cows in relation to stage of lactation, age, production level and presence of pathogens. *Netherlands Milk and Dairy J.*, 37: 1/2, 79-90
92. Jackson, N.S.; Hardin, D.K.; Randle, R.F. and Boyle, C.R. (1991) Somatic cell count in first lactation cows from *Staphylococcus* positive versus negative herds. *Journal of Dairy Science*, supplement 1, page 293.
93. Jarayao, B.M. and Oliver, S.P. (1994) PCR-based DNA fingerprinting for identification of *Streptococcus* and *Enterococcus* species isolated from bovine milk. *Journal of Food Protection*, 57:3 240-245, 248.
94. Jeffrey, D.C. (1985) The incidence of mastitic bacteria in total bacterial count tests of raw milk supplies. *J. of Applied Bacteriology*, 59:6 ix.
95. Jensen, N.E. and Knudsen, K. (1991) Interquarter comparison of markers of subclinical mastitis: somatic cell count, electrical conductivity, NGase and antitrypsine. *Journal of Dairy Research*, 58:4. 389-399.
96. Jonsson, P.; Olsson, L.O.; Olofson, A.S.; Fzlth, C.; Holberg, O.; Funke, H. (1991) Bacteriological investigations of clinical mastitis in heifers in Sweden. *Journal of Dairy Research*, 58:2 179-185.
97. Jones, G.F. (1989) Cause, occurrence and clinical signs of mastitis and anorexia in cows in Wisconsin study. *Journal of the Am. Vet. Med. Ass.* 195:8 1108-1113.

98. Jones, G.F. and Ward, G.E. (1990) Evaluation of a scheme for predicting the Gram negative staining reaction of organisms causing bovine mastitis. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 196:4 597-599.
99. Jones, T.O. (1990) *E. coli* mastitis in dairy cattle - a review of the literature. *Veterinary Bulletin*, 60:3 205-231.
100. Jones, G.M. (1991) Analysis of DHI cow and herd bulk tank samples for *S. aureus* antibody levels. *Journal of Dairy Science*, 74: supplement 1, 161.
101. Kaartinen, J.L. and Jensen, N.E. (1988) Use of a NAGase to detect teat canal inflammations. *Journal of Dairy Research*, 55:4 603-607.
102. Kaartinen, L.; Ali-Vehmas, T.; Mattila, T. and Sandholm, M. (1989) Bacterial growth in mastitic whey in relation to bacterial association with mastitis. *Veterinary Microbiology*, 21:2 155-163.
103. Kapur, M.P. (1981) Significance of *S. epidermidis* in bovine IMI. *Indian Journal of Dairy Science*, 34:1 102-103.
104. Kerhli, M.E. Jr (1985) Characterization of the effect of Gram negative LPS on bovine neutrophils in the pathogenesis of coliform mastitis. *Journal of Dairy Science*, 68: sup. 1, 202.
105. Kerhli, M.E. (1994) Factors affecting milk somatic cell and their role in health of the bovine mammary gland. *Journal of Dairy Science*, 77:2 619-627.
106. Kitchen, B.J. (1984) Relationship between the level of NAGase in bovine milk and the presence of mastitis pathogens. *J. of Dairy Research*, 51:1 11-16.

107. **Kneifel, W. et al (1992)** Adaptation of two commercially available DNA probes for the detection of *E. coli* and *S. aureus* to selected field of dairy hygiene - an exemplary study. *Zentralblatt-für-Hygiene-und-Umweltmedizin*, **192:6** 544-553.
108. **Knaudsen, K. and Jensen, N.E. (1990)** The diagnosis of subclinical mastitis by redefinition of the interquarter ratio and definition of the interquarter variation using analysis of variance methods. *J. of Dairy Research*, **57:3** 325-330.
109. **Kristula, M.A. et al (1992)** Use of a repeated-measures logistic regression model to predict chronic mastitis in dairy cows. *Preventive Vet. Med.*, **14:1-2** 57-68
110. **Lauirou, Y., Rainard, P., et al (1991)** Purification of the protein X of *S. agalactiae* with a monoclonal antibody. *FEMS Microbiol. Letters*, **80**:141-146
111. **Lebret, P. et Benas, B (1986, 1987 et 1988)** Diagnostique epidemiologique des mammites bovines en élevage laitier. Réalisation d'un système expert. *Revue de Médecine Veterinaire*, **137:3** 175-180 (part I), **137:7** 491-497 (part II), **138:8-9** 715-727 (part III) et **139:4** 379-388 (part IV).
112. **Lee, C.S.; Meensen, E. and Brandon, M.R. (1992)** Local immunity in the mammary gland. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, **32** 1-11.
113. **Lescourret, F.; Coulon, J.B. et Faye, B. (1995)** Predictive model of mastitis occurrence in the dairy cow. *Journal of Dairy Science*, **78:10** 2167-2177.
114. **Liljus, E.M. and Pesonen, U. (1990)** Use of inflammatory cell activities in bovine milk to diagnose mastitis. *American J. of Vet. Research*, **51:10** 1527-1533
115. **Linton, A.H. (1984)** Studies on the association of *E. coli* with bovine mastitis. *British Veterinary Journal*, **140:4** 368-373.

116. Loeffler, D.A.; Creasy, M.T.; Norcross, N.L. and Paape, M.J. (1983) ELISA for detection of leukocidin toxin from *S. aureus* in bovine milk samples. *J. of Clinical Microbiology*, 26:7 1331-1334.
117. Lohuis, J.A.C.M. et al (1990) Preinfection functions of blood PMN leukocytes and the outcome of experimental *E. coli* mastitis in the cow. *Journal of Dairy Science*, 73: 342-350.
118. Lohuis, J.A.C.M.; Shukken, Y.H.; Verheijden, J.H.M.; Brand, A. and Van Miert, S.J.P.A.M. (1990) Effect of severity of systemic signs during the acute phase of experimentally induced *E. coli* mastitis on milk production losses. *Journal of Dairy Science*, 73:2 333-341.
119. Longo, F.; Beguin, J.C.; Consalvi, P.J. et Deltor, J.C. (1994) Some epidemiological data on subclinical mastitis in the dairy cow. *Revue de Médecine Veterinaire*, 145:1 43-47.
120. Mamo, W. (1989) Physical and biochemical surface properties of Gram positive bacteria in relation to adhesion to bovine mammary cells and tissues. A review of the literature. *Revue Scientifique et Technique*, 8:1 163-176.
121. Magariños, H. (1984) Efecto del almacenamiento de la leche cruda sobre el recuento de células somáticas empleando métodos de viscosímetro y recuento microscópico directo. I. Ensayo bajo condiciones controladas de laboratorio. *Archivos de Medicina Veterinaria*, 16:1 35-40.
122. Magariños, H.; Molina, C.H.; Haverbeck, A.J.; Heimlich, M.W.; Selaive, V.S. y Morzella, R.M. (1984) Utilización del método electrónico Coulter Counter para el SCC en leche cruda refrigerada. *Bulletin de la IDF*, 177, 179-186.
123. Mahtje, K.; Huijsmans, P.J.M.; Rossing, W. and Hogenerf, P.H. (1992) The efficacy of in-line measurement of quarter milk electrical conductivity, milk yield and milk temperature for the detection of clinical and subclinical mastitis. *Livestock Production Science*, 30, 239-249.

124. **Matsushita, T.; Dinsmore, R.P.; Eberhart, R.J.; Jones, G.M. and McDonald, J.S. (1990)** Performance studies of an ELISA for detecting *S. aureus* antibody in bovine milk. *J. of Veterinary Diagnostic Invest.*, 2:3 163-166.
125. **Matthews, K.R.; Harmon, R.J. and Langlois, B.E. (1991)** Effect of naturally occurring CNS infections on new infections by mastitis pathogens in the bovine. *Journal of Dairy Science*, 74:6 1855-1859.
126. **Matthews, K.R.; Harmon, R.J. and Langlois, B.E. (1992)** Prevalence of *Staphylococcus* species during the periparturient period in primiparous and multiparous cows. *Journal of Dairy Science*, 75:7 1835-1839.
127. **Matthews, K.R.; Jarayae, B.M. and Oliver, S.P. (1992)** Restriction endonuclease fingerprinting of genomic DNA of *Staphylococcus* species of bovine origin. *Epidemiology and Infection*, 109:1 59-68.
128. **Mattila, T. (1986)** Bacterial growth in milk. *Journal of Veterinary Medicine, Series B*, 33:3 174-179.
129. **Mattila, T. (1986)** Determinants of bacterial replication rates in mastitic whey. *Journal of Dairy Research*, 53:2 197-202.
130. **Mattila, T. and Sandholm, M. (1986)** Milk NAGase as an indicator for bovine mastitis. *Proceedings of the Symposium on mastitis control and hygienic production of milk*, 153-161.
131. **McDonald, J.S. (1984)** Streptococcal and staphylococcal mastitis. *Veterinary Clinics of North America, Large Animal Practice*, 6:2 269-285.

132. **Mijnen, E.; Jaartveld, F.H.J.; Albers, G.A.A.; Verstegen, M.W.A. and Tielen, M.J.M.** (1982) The value of cell count, lactose content, pH and conductivity of milk for mastitis detection in individual cows. *Netherland Milk Dairy Journal*, **36**: 65-77.
133. **Miller, R.H.; Emanuelson, U.; Pesson, E.; Brolund, L.; Phillipsson, J. and Funke** (1983) Relationships of milk somatic cell count to daily milk yield and composition. *Acta Agriculturae Scandinavica*, **33**:3 209-223.
134. **Miller, R.H.** (1984) Relationships of current bacteriological status of the mammary gland to daily milk yield and composition. *Acta Agriculturae Scandinavica*, **34**:2 133-144.
135. **Miller, G.Y.; Bartlett, P.C.; Lance, S.E.; Anderson, J. and Heider, L.E.** (1993) Costs of clinical mastitis and mastitis prevention in dairy herds. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, **202**: 8, 1230-1236.
136. **Millerton, J.E.; Bramley, A.J.; Staker, R.T.; McIlanmon, C.H.** (1995) Patterns of IMI and clinical mastitis over a five years period in a closely monitored herd applying mastitis control measurements. *Journal of Dairy Research*, **62**:1 39-50
137. **Morrison, J.R.A. and Wright, C.L.** (1984) *S. agalactiae* serotypes in the southwest of Scotland. *Veterinary Record*, **115**, page 439.
138. **Nader-Fúho, A. et al** (1985) The sensitivity of the Whiteside test for detecting mastitis milk at dairy factories. *Revista do Instituto de Laticínios*, **40**:237 11-14.
139. **Ngatia, T.A.; Jensen, N.E. and Berg, B.B.** (1991) Changes in the bovine udder quarters naturally infected by *Corynebacterium bovis*. *British Veterinary Journal*, **147**:5 463-468.
140. **Nickerson, S.C.; Owens, W.E. and Boddie, R.I.** (1995) Mastitis in dairy heifers: initial studies on prevalence and control. *J. of Dairy Science*, **78**: 1607-1618

141. Nordkang, M.L.; Nesse, L.L.; Norcross, N.L. and Godding, R. (1994) A field trial with an experimental vaccine against *S. aureus* mastitis in cattle. 1. Clinical parameters. *J. of Dairy Science*, **77**:5 1267-1275. 2. Antibody response. *J. of Dairy Science*, **77**:5 1276-1284.
142. Oliver, S.P. and Mitchell, B.A. (1984) Prevalence of mastitis pathogens in herds participating in a mastitis control program. *Journal of Dairy Science*, **67**:19 2436-2440.
143. Oliver, S.P. and Juneja, V.K. (1990) Growth of *C. bovis* in mammary secretions during physiological transitions of the bovine mammary gland. *Journal of Dairy Science*, **73** 351-356.
144. O'Sullivan, C.A.; Joyce, P.J.; Sloan, T. and Shattock, A.G. (1992) Capture immunoassay for the diagnosis of bovine mastitis using a monoclonal antibody to PMNs. *Journal of Dairy Research*, **59**, 123-133.
145. Oz, H.H. (1984) Analysis of growth rate of Gram positive mastitic pathogenic bacteria entering bulk tank at different milkings. *Dissertations Abstracts International, Series B, Sciences and Engineering*, **45**:3 363 pp
146. Oz, H.H. (1985) Environmental mastitis (a review) *Veterinary Bulletin*, **55**:11 829-840.
147. Oz, H.H. (1986) Growth of Gram positive mastogenic bacteria in normal, stimulated bulk tank and mastitic milk held at simulated fluctuating temperatures of farm bulk tank. *J. of Dairy Science*, **69**:8 2060-2065.
148. Pankey, J.W.; Dreschler, P.A. and Wildman, E.E. (1991) Mastitis prevalence in primigravid heifers at parturition. *Journal of Dairy Science*, **74**:5 1150-1152.
149. Park, Y.H. et al (1992) Bovine mononuclear leukocyte subpopulations in peripheral blood and mammary gland secretions during lactation. *Journal of Dairy Science*, **75**: 998-1006.

150. **Pesson, K.; Carlsson, A.; Hambleton, C. and Guidry, A.J. (1992)** Immunoglobulines, lysozyme and lactoferrine in the teat and udder of the dry cow during endotoxin-induced inflammation. *J. of Veter. Medicine, series B*, **39**, 165-174
151. **Philipsson, J.; Rai, G. and Berglund, B. (1995)** Somatic cell count as a selection criterion for mastitis resistance in dairy cattle. *Livestock Production Science*, **41**, 195-209.
152. **Pocieccha, J.Z. (1989)** Influence of *C.bovis* on constituents of milk and dynamics of mastitis. *Veterinary Record*, **125:25** page 628.
153. **Pyorala, S. and Mattila, T. (1987)** Inflammatory changes during experimental bovine mastitis caused by *S. aureus*, *S. dysgalactiae* and *S. uberis*. *Journal of Veterinary Medicine, Series A*, **34:8** 573-584.
154. **Pyorala, S. and Suvajarvi, J. (1987)** Bovine acute mastitis. I. Clinical aspects and parameters of inflammation in mastitis caused by different pathogens. *Journal of Veterinary Medicine, Series B*, **34:8** 573-584.
155. **Pyorala, S.; Jenzisura-Senser, H. and Mero, M. (1992)** Clinical, bacteriological and therapeutic aspects of bovine mastitis caused by aerobic and anaerobic pathogens. *British Veterinary Journal*, **148**: 54-61.
156. **Quinones, J.; Demo, M.; Pajari, C.; Martin, V. and Bagni, G. (1989)** Resultados obtenidos con la prueba de California para mastitis, recuento celular somático y análisis bacteriológico en vacas de ordeño. *Veterinaria Argentina* **6:51** 62-68
157. **Rainard, P. et Poutrel, B. (1984)** Non-random distribution of udder infections among cows. Evaluation of some contributing factors. *Annales de Recherche Veterinaire*, **15:1** 119-127.

158. Rainard, P. (1986) Bacteriostatic activity of bovine milk lactoferrin against mastitic bacteria. *Veterinary Microbiology*, 11:4 387-392.
159. Rainard, P.; Lautrou, Y. and Poutrel, B. (1988) Ingestion and killing of *S. agalactiae* by bovine PMN in the presence of natural opsonins. *Veterinary Microbiology*, 18:1 41-50.
160. Rainard, P. et Poutrel, B. (1988) Effect of naturally occurring IMIs by minor pathogens or new infections by major pathogens in cattle. *American Journal of Veterinary Research*, 49:3 327-329.
161. Rainard, P.; Lautrou, Y.; Sarradin, P. and Poutrel, B. (1991) Protein X of *S. agalactiae* induces opsonic antibodies in cows. *J. of Clinical Microbiology*, 29:9 1842-1846.
162. Roberson, J.R.; Fox, L.K.; Hancock, E.D. and Besser, T.E. (1992) Evaluation of methods for differentiation of coagulase positive staphylococci. *Journal of Clinical Microbiology*, 30:12 3217-3219.
163. Robinson, T.C.; Jackson, E.R. and Mar, A. (1988) Mastitis incidence in quarters with different infection status at drying off and calving in two treatment groups. *British Veterinary Journal*, 144: 166-173.
164. Rosa, M. de la; Pérez, M.; Carazo, C.; Pareja, L.; Orts, A. y Cantudo, P. (1984) Medios de cultivo para la detección e identificación de *S. agalactiae*. *Microbiologia SEM* 10, 181-186.
165. Rea, M.C.; Cogan, T.M. and Tobin, S. (1992) Incidence of pathogenic bacteria in raw milk in Ireland. *J. of Applied Bacteriology*, 73:4 331-336.

166. Ruegg, P.L.; Guterbock, W.M.; Holmberg, C.A.; Gay, J.M.; Weaver, L.D.; Wilton, R.W. (1992) Microbiologic investigation of an epizootic of mastitis caused by *Serratia marcescens* in a dairy herd. *J. of American Veterinary Medical Association*, 200:2 184-189.
167. Schukken, Y.H. et al (1989) Incidence of clinical mastitis on farms with low somatic cell count in bulk milk. *Veterinary Record*, 125:3 60-63.
168. Schukken, Y.H.; Geer, D. van de; Grammers, F.J.; Smith, J.A.H.; Brand, A. and van de Geer, D. (1989) IMIs and risk factors for clinical mastitis in herds with low somatic cell count in bulk milk. *Veterinary Record*, 125:15 293-296.
169. Schukken, Y.H.; Grammers, F.J.; van de Geer, D.; Erb, A.N. and Brand, A. (1991) Risk factors for *E. coli* and *S. aureus*. *J. of Dairy Science*, 74:3 826-832.
170. Schukken, Y.H.; Casella, G. and van der Broek, J. (1991) Overdispersion in clinical mastitis data from dairy herds: a negative binomial approach. *Preventive Veterinary Medicine*, 10: 239-245.
171. Sears, P.M.; Wilson, D.J.; González, R.N. and Hancock, D.D. (1991) Microbiological results from milk samples obtained premilking and postmilking for the diagnosis of bovine IMI. *Journal of Dairy Science*, 74: 4183-4188.
172. Sears, P.M. (1993) Procedures for mastitis diagnosis and control. *Veterinary Clinics of North America, Food Animal Practice*, 9:3 445-468.
173. Sedinova, V. et al (1984) Direct enumeration of milk somatic cell collected on membrane filters. *Archiv-für-Experimentelle-Veterinärmedizin*, 38:6 884-893.
174. Sender, G.; Juga, J.; Hellman, T. and Saloniemi, H. (1992) Selection against mastitis and cell count in dairy cattle breeding programs. *Acta Agriculturae Scandinavica, Sect. A* 42: 205-210.

175. **Serieys, F. (1985)** Interpretation des concentrations cellulaires du lait individuel de vache pour le diagnostic de l'état d'infection mammaire. *Ann. de Recherches Veterinaires*, 16:3 263-269.
176. **Sharabi, F.K. et al (1986)** Catalase measurement. An indirect technique for counting cells in milk evaluation of the method in Egyptian dairy herds. *Recueil de Médecine Veterinaire*, 162:4 505-509.
177. **Shotts, E.B. Jr and Leard, A.T. (1984)** Microbiologic aspects of mastitis diagnosis. *Veterinary Clinics of N. Amer., Large Animal Practice*, 6:2 247-255.
178. **Sischo, W.M.; Heider, L.E.; Miller, G.Y. and Moore, D.A. (1993)** Prevalence of contagious pathogens of bovine mastitis and use of mastitis control practices. *Journal of American Vet. Medic. Assoc.*, 202:4 595-600.
179. **Smith, K.L. (1985)** Environmental mastitis: cause, prevalence, prevention. *Journal of Dairy Science*, 68:6 1531-1553.
180. **Tejedor, T.; Baselga, R. y Amorena, B. (1990)** Aspectos actuales de la lucha contra la mamitis en el ganado vacuno lechero. *ITEA.86A:2* 73-91.
181. **Timms, L.L. (1985)** Studies on bovine mastitis. I. The role of minor pathogens. II. NAGase for monitoring udder health. *Dissertation Abstracts International, Series B*, 45:12 3742 238 pp.
182. **Todhunter, D.A. (1990)** Growth of Gram negative bacteria in dry cow secretion. *Journal of Dairy Science*, 73:2 363-372.
183. **Todhunter, D.A.; Smith, K.L.; Hogan, J.S. and Schroenberger (1991)** Gram negative bacterial infections of the mammary gland in cows. *American Journal of Veterinary Research*, 52:2 184-183.

184. Torgeson, P.R.; Gibbs, H.A. and Anderson, D.B. (1992) High incidence of clinical mastitis due to *S. aureus* in two dairy herds with low milk counts. *Veterinary Record*, 130:3 54-55
185. Trinidad, P.; Nickerson, S.C. and Alley, T.R. (1990) Prevalence of IMI and teat canal colonization in unbred and primigravid dairy heifers. *Journal of Dairy Science*, 73:1 107-114.
186. Thyssen, I. (1993) Monitoring bulk tank somatic cell count by a multi-process Kalman filter. *Acta Agriculturae Scandinavica, A*, 43: 58-64.
187. Tyler, J.; Spears, H.; Cullor, J.; Smith, W.; Nelson, R. and Martin, J. (1991) Antigenic homology among Gram negative organisms isolated from cattle with clinical mastitis. *Journal of Dairy Science*, 74:4 1235-1242.
188. Vasavada, P.C. (1993) Rapid methods and automation in dairy microbiology. *Journal of Dairy Science*, 76:10 3101-3113.
189. Vecht, V. (1990) Some reflections on application of DNA probes in mastitis diagnosis. *Mastitis Newsletter*, 112, 4-5.
190. Villanueva, M.R.; Tyler, J.W. and Thurmond, M.C. (1991) Recovery of *S. agalactiae* and *S. aureus* from fresh and frozen bovine milk. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 198:8, 1398-1400.
191. Waage, S. et al (1994) Evaluation of a cow-side test for detection of Gram negative bacteria in milk from cows with mastitis. *Acta Veterinaria Scandinavica*, 35:2 207-212.
192. Wanger, A.R. and Dunny, G.M. (1984) Specific agglutination of *S. agalactiae* from bovine mastitis by casein components of bovine milk. *J. of Dairy Science*, 67:10 2441-2445.
193. Wanger, A.R. and Dunny, G.M. (1987) Identification of *S. agalactiae* protein antigen associated with bovine mastitis isolates. *Infection and Immunity*, 55:5 1170-1175.

194. **Watts, J.L.; Pankey, J.W. and Nickerson, S.C. (1984)** Evaluation of the Staph-Ident and Staph-ase systems for identification of staphylococci from bovine IMIs. *Journal of Clinical Microbiology*, 20:3 448-452.
195. **Watts, J.L. (1988)** Characterization and identification of streptococci isolated from bovine mammary glands. *Journal of Dairy Science*, 71:6 1616-1624.
196. **Watts, J.L. and Owens, W.E. (1988)** Evaluation of the rapid mastitis test for identification of *S. aureus* and *S. agalactiae* isolated from bovine mammary glands. *Journal of Clinical Microbiology*, 26:4 672-674.
197. **Watts, J.L. (1989)** Prevalence of staphylococcal species in four dairy herds. *Research in Veterinary Science*, 46:1 1-4.
198. **Watts, J.L. (1989)** Evaluation of the Rapid Strep System for identification of Gram positive, catalase negative, cocci isolated from bovine IMIs. *J. of Dairy Science*, 72:2728-2732.
199. **Watts, J.L.; Ray, C.H. and Washburn, P.J. (1991)** A convenient method for differentiation of coagulase negative staphylococci isolated from bovine mammary glands. *Journal of Dairy Science*, 74:2 426-428.
200. **Watts, J.L. and Washburn, P.J. (1991)** Evaluation of the Staph-Zym system with staphylococci isolated from bovine IMIs. *J. of Clinical Microbiology*, 29:1 59-61
201. **Westrieber, J.G. and Leipold, H.W. (1993)** *S. aureus* mastitis. Part I. Virulence, defense mechanisms, and establishment of infection. *Compendium-on-Continuing-Education-for-the Practice Veterinary*, 15:11 1561-1569.

202. **White, M.E.; Glickman, L.T.; Montgomery, M.E.; Barne-Pallesen, F.D.; Stem, E.S.; Dinsmore, R.P.; Powers, M.S.; Powers, P.; Smith, M.C. and Jasko, D. (1987)** Analysis of the clinical findings used to diagnose coliform mastitis in dairy cows, and comparison with a prediction model. *Cornell Veterinarian*, **77:1** 13-20.
203. **Wilson, J. and Jeffrey, D.C. (1987)** A selective medium for mastitis streptococci in milk. *J. of the Science and Dairy Technology*, **40:2** 27-29.
204. **Wilson, D.J. and Sears, P.M. (1992)** Clinical mastitis caused by different types of pathogens: differences in milk production loss, recovery, age at onset, and milk NAGase. *Agri-Practice* **13:8** 13-21.
205. **Woodward, W.D. (1988)** Teat skin normal flora and colonization with mastitis pathogen inhibitors. *Veterinary Microbiology*, **17:4** 357-365.
206. **Zorah, K.T. et al (1986)** Clinico-immunological tests for the diagnosis of mastitis due to *S. agalactiae*, *S. aureus* and *E. coli*. *Proceedings of 14th World Congress on Disease at Cattle*, **2**: 1088-1093.
207. **Zorah, K.T. (1993)** Detection of bacterial antigens in milk samples from clinical cases of bovine mastitis in which culture is negative. *Veterinary Record*, **132:9** 208-210.

Tabla 1. Listado de muestras recogidas en los establos LP y LSC, SCC de las muestras de leche de tanque, gérmenes aislados en ellas y tipo de diagnóstico

NMUESTRA	FECHA MUJ	SCCTOTEST	GERMPATOC1	DIAGNMUES1
		0		
lp-1	1/04/94	1000000	E. coli, Staph. epidermidis y Strep. lactis	Caracter. enzimát. y cultural
lp-2	8/04/94	650000	Staph. epidermidis y Enterococcus faecium	Caracter. enzimática
lp-3	15/04/94	520000	Coryn. spp, Staph. epidermidis y Lactobacillus casei	Caracter. enzimát. y microsc.
lp-4	22/04/94	480000	Strep. bovis y Strep. acidominimus	Caracteriz. enzimática
lp-5	29/04/94	700000	E. coli, Coryn. spp, Staph. epidermidis y Strep. lactis	Caracter. enzimática y cultura
lp-6	6/05/94	350000	Staph. epidermidis y Enterococcus faecium	Caracteriz. enzimát. y cultural
lp-7	13/05/94	230000	Micrococcus luteus y Strep. lactis	Caracter. enzimát. y microscop
lp-8	20/05/94	400000	Coryn. spp, Staph. epidermidis, Enterococcus faecium	Caracteriz. cultural y enzimát.
lp-9	27/05/94	204000	Staph. epidermidis y Enterococcus faecium	Caracter. enzim. y aglutinación
lp-10	3/06/94	1320000	Strep. dysgal., Strep. lactis, Lactobacillus spp	Caract. API y cultural
lp-11	17/06/94	796000	E. coli y Strep. lactis	Caracter. API y enzimát. no API
lp-12	24/06/94	1065000	E. coli, Enterococcus faecium y Lactobacillus spp	Caracter. enzim. API y no API
lp-13	1/07/94	1126000	E. coli, Staph. epidermidis y Enterococcus faecium	Caracter. enzimát. API y no API
lp-14	8/07/94	900000	Staph. epidermidis, Ent. sakazakii y Strep. lactis	Caracter. API y no API
lp-15	15/07/94	970000	E. coli, Strep. bovis, Staph. epidermidis, Strep. lactis	Caract. API y no API
lp-16	22/07/94	1507000	E. coli, Staph. aureus y Enterococcus faecium	Caracter. enzimática API
lp-17	29/07/94	724000	Staph. aureus, E. coli y Enterococcus faecium	Caract. API y cultural/microscop
lp-18	27/09/94	405000	Staph. epidermidis y Strep. lactis	Caract. cultural y enz. no API
lp-19	4/10/94	1205000	Staph. aureus, Staph. epidermidis y Strep. lactis	Caracter. API y no API
lp-20	11/10/94	106000	Staph. epidermidis y Aeromonas sobria	Caracter. enzimática API
lp-21	18/10/95	158000	Staph. xylosum, Strep. lactis y Vibrio spp	Caract. enz. API y no API
lp-22	25/10/94	460000	Staph. epidermidis, Strep. spp y Klebsiella pneumoniae	Caract. enzimática y cultural
lp-23	8/11/94	456000	Staph. epidermidis y Strep. lactis	Caract. enzimát. no API
lp-24	1/12/94	1169000	Staph. aureus, Staph. epidermidis y Strep. lactis	Caracter. API y no API
lp-25	22/11/94	1906000	Staph. aureus, Enterococcus faecium y Strep. lactis	Caracter. API
lp-26	28/11/94	1000000	Staph. aureus	Caracter. enzim. API y cultural
lp-27a	12/12/94	1355000	Staph. aureus y Staph. epidermidis	Caracter. API y no API
lp-27n	14/12/94	1208000	Staph. aureus, Ent. cloacae y Strep. lactis	Caract. API y no API
lp-28	20/12/94	1806000	Staph. aureus, Ent. sakazakii y Enterococcus faecalis	Caracter. API
lp-29	28/12/94	024000	Staph. aureus y Enterococcus faecium	Caracter. API
lp-30	7/01/95	850000	E. coli y Staph. lentus	Caracter. API
lp-31	15/01/95	400000	Staph. epidermidis	Caracter. API
lp-32	22/01/95	750000	Staph. xylosum y Strep. lactis	Caracter. API y no API
lp-33	29/01/95	800000	Staph. xylosum y Enterococcus faecium	Caracter. API y cultural
lp-34	6/02/95	300000	Staph. epidermidis	Caracter. no API
lp-35	13/02/95	700000	Staph. xylosum	Caracter. API
lp-36	20/02/95	900000	Staph. xylosum y Aeromonas sobria	Caracter. API
lp-37	27/02/95	825000	Staph. aureus y Enterococcus faecalis	Caracter. API y no API
lsc-1	27/05/94	696000	Staph. epidermidis y Enterococcus faecium	Caract. no API y aglutinación
lsc-2	3/06/94	2455000	Coryn. bovis, Strep. pyogenes y Staph. epidermidis	Caract. enzim. y aglutinación
lsc-3	10/06/94	2655000	Coryn. spp y Listeria spp	Caracter. enzimát. y microscop
lsc-4	17/06/94	2114000	Staph. epidermidis, Lactobacillus casei, Micrococcus luteus	Caracter. enzimát. y microscop
lsc-5	24/06/94	2904000	E. coli, Staph. epidermidis y Strep. lactis	Caract. enz. API y no API
lsc-6	1/07/94	2765000	Staph. epidermidis y Enterococcus faecium	Caract. enz. no API y aglutinac.
lsc-7	8/07/94	3005000	Strep. dysgalactiae y Enterococcus faecium	Caract. enzim. y aglutinación
lsc-8	15/07/94	3084000	Staph. aureus, E. coli y Strep. lactis	Caract. enzimát. API y no API
lsc-9	22/07/94	130000	Staph. epidermidis, Micrococcus luteus y Coryn. xerosis	Caract. enzimát. y cult./micro
lsc-10	29/07/94	844000	Staph. aureus y Enterococcus faecalis	Caract. API y aglutinación
lsc-11	27/09/94	1787000	E. coli y Strep. lactis	Caract. API y no API
lsc-12	11/10/94	640000	E. coli y Strep. lactis	Caract. enzimát. API
lsc-13	18/10/94	381000	E. coli y Staph. epidermidis	Caract. enzim. API
lsc-14	25/10/94	1336000	Strep. bovis, Staph. epidermidis y Strep. lactis	Caracter. enzimática
lsc-15	8/11/94	2784000	E. coli y Staph. aureus	Caracter. API
lsc-16	15/11/94	1419000	E. coli y Staph. epidermidis	Caracter. API
lsc-17	22/11/94	319000	Staph. aureus, Ent. sakazakii y Strep. lactis	Caracter. API
lsc-18	28/11/94	1300000	Staph. aureus y Klebsiella pneumoniae	Caract. enzimática API
lsc-19a	12/12/94	1080000	Staph. aureus y E. coli	Caracter. API
lsc-19n	14/12/94	757000	Staph. aureus	Caracter. API y no API
lsc-20	20/12/94	1338000	Staph. aureus, Enterococcus faecalis y Hafnia aivei 1	Caracter. enz. API
lsc-21	28/12/94	756000	Staph. aureus	Caracter. API
lsc-22	7/01/95	1100000	Staph. aureus, Strep. lactis y Hafnia aivei 1	Caracter. API y no API
lsc-23	15/01/95	780000	Staph. aureus y Enterococcus faecalis	Caracter. API y no API
lsc-24	22/01/95	1200000	Staph. aureus y E. coli	Caracter. API
lsc-25	29/01/95	400000	Aerococcus viridans	Caracter. API
lsc-26	6/02/95	950000	Staph. aureus y Serratia liquefaciens	Caracter. API

ESTABLO LP (gérmenes)	Nº de casos
<i>Staphylococcus aureus</i>	10
<i>S. epidermidis</i>	18
<i>S. xylosus</i>	6
<i>S. lentus</i>	1
<i>Micrococcus luteus</i>	1
<i>Streptococcus dysgalactiae</i>	1
<i>S. lactis</i>	16
<i>S. bovis</i>	2
<i>S. acidominimus</i>	1
<i>Corynebacterium bovis</i>	4
<i>E. coli</i>	11
<i>Enterobacter sakazakii</i>	1
<i>E. cloacae</i>	1
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	1
<i>Aeromonas sobria</i>	2
<i>Lactobacillus casei</i>	3
<i>Candida albicans</i>	1
<i>Enterococcus faecium</i>	11
<i>E. faecalis</i>	2

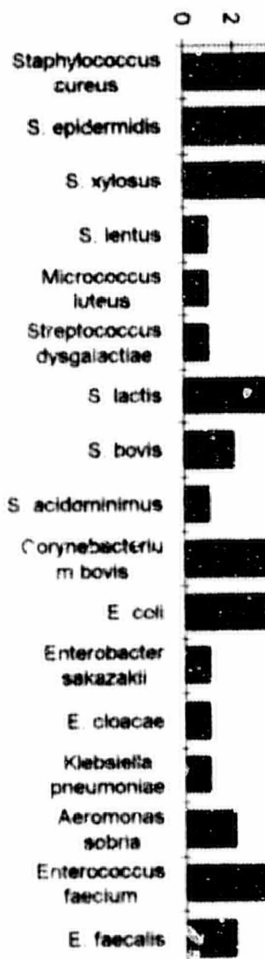
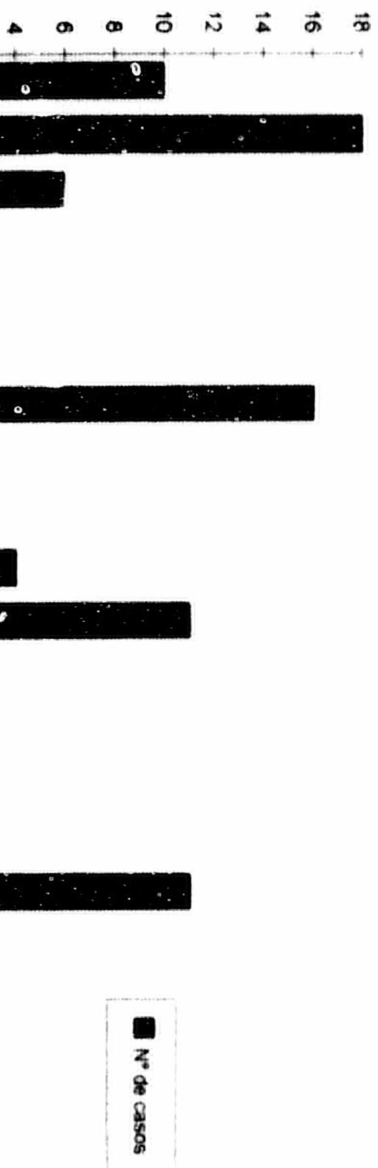


GRAFICO2.XLC



ESTABLO LSC (gérmenes)	Nº de casos
<i>Staphylococcus aureus</i>	11
<i>S. epidermidis</i>	8
<i>S. xylosum</i>	2
<i>Streptococcus dysgalactiae</i>	1
<i>S. lactis</i>	8
<i>S. bovis</i>	1
<i>S. pyogenes</i>	1
<i>Enterococcus faecium</i>	4
<i>E. faecalis</i>	1
<i>Aerococcus viridans</i> 2	1
<i>Micrococcus luteus</i>	2
<i>Corynebacterium bovis</i>	2
<i>C. xerosis</i>	1
<i>E. coli</i>	9
<i>Enterobacter sakazakii</i>	1
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	1
<i>Serratia liquefaciens</i>	1
<i>Hafnia alvei</i>	1
<i>Lactobacillus casei</i>	1

Staphylococcus aureus

S. epidermidis

S. xylosum

Streptococcus dysgalactiae

S. lactis

S. bovis

S. pyogenes

Enterococcus faecium

E. faecalis

Aerococcus viridans 2

Micrococcus luteus

Corynebacterium bovis

C. xerosis

E. coli

Enterobacter sakazakii

Klebsiella pneumoniae

Serratia liquefaciens

Hafnia alvei

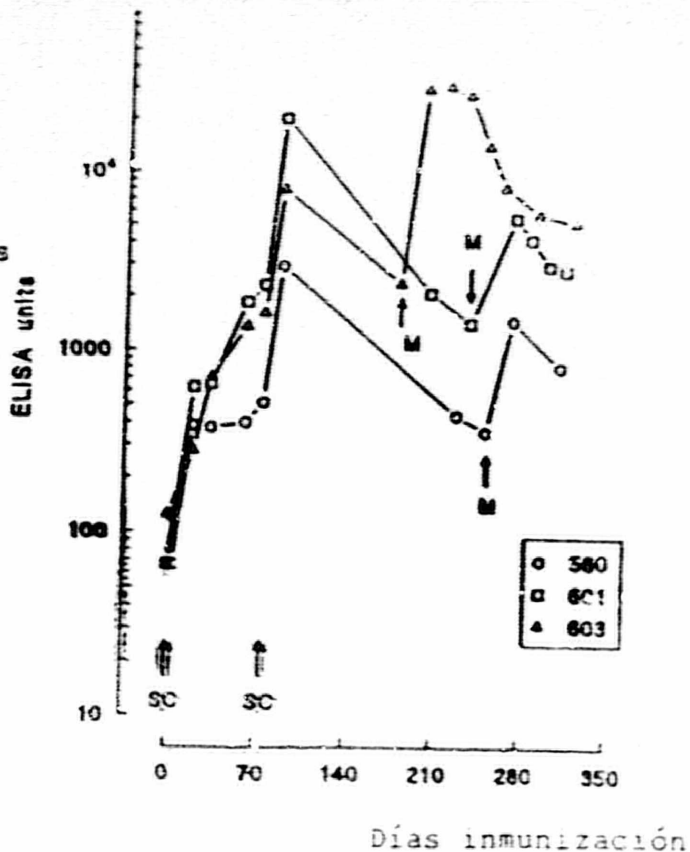
Lactobacillus casei

GRÁFICO 1.MLC



Nº de casos

Figura 1. Cinética de la respuesta de anticuerpos en el suero de las tres vacas (nº 560, 601 y 603) inmunizadas con proteína X purificada, procedente de cepas de *Streptococcus agalactiae* portadoras de la proteína X. El suero se testó con un ELISA. El término SC se refiere a que la inoculación del antígeno fue subcutánea.



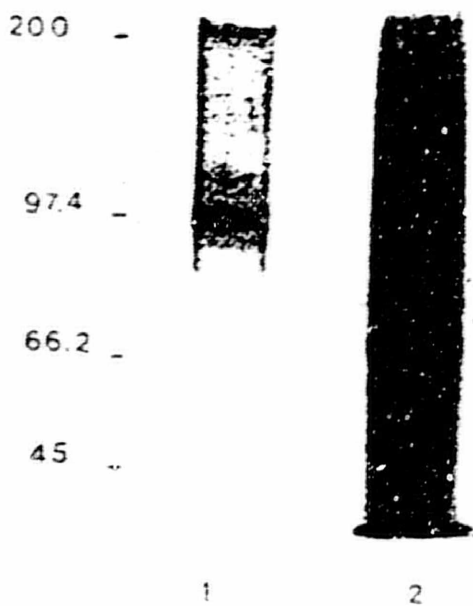


Figura 2. Análisis por SDS-PAGE del extracto con proteína X de la cepa de la que se obtuvo.

Columna 1, proteína X purificada por cromatografía de afinidad.

Columna 2, extracto crudo portando la proteína X, antes de cromatografía.

Los números indican el peso molecular en KDa.

Figura 3. Análisis por inmunoblotting de la proteína X.

Los números indican los pesos moleculares en KDa.

205 _

116 _

97.4

66 _

45 _



FACTOR ANALYSIS

VARIMAX rotation 1 for extraction 1 in analysis 1 - Kaiser Normalization
 VARIMAX converged in 22 iterations
 Rotated Factor Matrix:

	Factor 1	Factor 2	Factor 3	Factor 4	Factor 5
REV	-.20779	-.02598	.11866	-.03425	-.05374
ASU	-.11729	-.01015	.06401	-.01610	-.02496
CBO	.19458	.31127	.82557	-.03871	.12296
CELP	.93414	-.03303	.10105	.05904	-.01562
CELY	.73047	-.10259	.14173	.03778	-.01592
CXE	.06977	.91520	-.04911	-.04586	-.01008
EOY	.16721	-.15176	-.18633	-.17683	-.13378
EFPE	.10093	-.12529	-.25410	-.18714	-.17915
EFCL	-.01199	-.01848	-.02300	.83184	-.05127
EMCL	.09984	-.01470	-.10219	-.04315	-.02921
EMER	.66182	.28628	.36843	-.02737	.06677
EMSA	-.02089	-.02710	-.04272	.09124	-.10499
NLL	.02482	-.03980	-.01849	.75561	.06239
KPW	-.06089	-.02327	-.01727	-.00761	-.08029
LCA	.09738	-.04555	.04257	-.02317	.78138
LIN	.16909	.05702	.18036	-.04768	-.00549
MLU	-.03244	-.01144	-.01934	.03370	.77797
SAUR	.17334	-.10982	-.19041	.44429	-.26691
SEPI	-.22126	.03803	.24414	-.30992	.05164
SLE	-.07667	.02637	.01997	.00509	.02257
SLE	-.08000	-.02364	.05398	-.13661	.00667
STAC	-.11926	.80007	-.07140	.03110	.01041
STBO	-.04240	.05772	-.00583	.01425	-.08983
STDY	.44602	-.03356	-.24385	-.12472	.27221
STLA	.09800	-.17867	-.18513	-.34278	.08634
STPY	.14915	-.07770	.79911	-.02350	-.09222
KYT	-.07497	-.03925	-.06001	-.07548	-.06197

	Factor 4	Factor 7	Factor 8	Factor 9	Factor 10
REV	.12451	-.09824	-.03144	-.02046	-.02783
ASU	-.69279	-.07575	-.05183	.04372	-.04179
CBO	-.00772	.00572	-.06880	.01178	-.01942
CELP	.09654	.03648	-.04581	.02465	-.00524
CELY	.10856	.02890	-.00604	-.07015	-.03516
CXE	.04371	-.04754	-.04441	.02843	.07508
EEO	.20773	-.10948	.09393	-.68189	-.13292
EFPE	.14343	-.21014	-.33153	.28704	-.43088
EFCL	.05347	.02689	-.08121	.06996	.21190
EMCL	.00895	-.00626	-.03548	.14132	-.06868
EMER	.09292	-.14200	-.04720	.07732	.02021
EMSA	.09387	-.04457	-.12469	.11113	.86742
NLL	-.00726	-.07025	.10245	.01398	-.12490
KPW	.07726	-.03535	-.07401	.05832	-.04187
LCA	.06883	-.02378	.02550	.04036	-.05980
LIN	-.02056	-.01337	-.12014	-.02401	.01541
MLU	.03938	-.02944	-.05999	.00328	-.00877
SAUR	.22812	.52438	-.24384	.05714	.07973
SEPI	.26510	-.49466	.09390	.22683	-.03413
SLE	-.01459	-.00701	-.08414	-.76367	-.06361
SLE	.07454	.86576	.02319	.09158	-.04009
STAC	.04635	.00701	.37595	.04254	-.08191
STBO	.08043	-.04679	.87915	.04599	-.07396
STDY	-.06750	-.00050	.11397	.18048	.02517
STLA	-.00047	-.01894	.39919	-.02456	.45214
STPY	.01128	-.02498	.04421	.02835	-.02657
KYT	-.83956	.00762	-.01335	.03964	-.00172

	Factor 11	Factor 12	Factor 13
EV	.16631	.75780	-.05516
SO	-.01547	-.13928	-.03167
BO	-.07863	.06820	.01450
ELP	.03186	-.05217	-.01214
ELT	.00641	-.05681	-.02852
NE	.00405	-.05268	.00141
CO	.60887	-.18039	-.13924
FAE	-.34619	.00217	-.28010
TCL	-.04739	.02272	-.05981
RCL	.76218	.16702	-.02101
EMR	.14887	.10444	-.09102
MSA	-.11920	.60348	-.11563
L	.00142	-.04227	.05020
N	-.01994	.01777	.93669

----- FACTOR ANALYSIS -----

VARIMAX rotation 1 for extraction 1 in analysis 1 - Kaiser Normalization.

VARIMAX converged in 27 iterations.

Rotated Factor Matrix:

	Factor 1	Factor 2	Factor 3	Factor 4	Factor 5
ASD	-.11081	-.01150	.04326	.03993	-.03830
CBJ	.16703	.10976	-.03299	.97466	.14016
CELP	.22766	-.04560	.06434	.321	.02582
CELT	.92413	-.11368	.04224	.16626	-.00669
CXE	-.04360	.92095	-.04660	-.07957	-.01533
EOD	.14926	-.15881	-.17131	-.16136	-.12639
EVAE	.10510	-.12692	-.18098	-.24734	-.15747
EFCL	.01407	-.01535	.82969	-.03349	-.05779
ENGER	.7235	.39406	-.03696	.13438	-.03493
ENSA	-.02121	-.03265	.04157	-.05103	-.10244
KAL	.01582	-.04125	.75853	-.00462	.04594
KPN	-.04976	-.02730	-.01345	-.03315	-.07784
LCA	.08391	-.05017	-.02502	.05709	.80284
LIN	.15973	.84559	-.04325	.18645	.00222
MIN	-.05197	-.00575	.03024	-.01595	.75260
NAOR	.15822	-.11427	.44333	-.17259	.24534
NEPT	-.25369	.05476	-.31517	.24117	.02758
SLE	-.0582	.03267	.00521	.01159	.02345
SLI	-.09079	-.01751	-.14955	.04914	-.00160
STAC	-.10246	.79724	.02986	-.08064	-.04776
STRO	-.06027	.05264	.01324	-.01050	-.09608
STDY	.67441	-.04892	-.12482	-.23731	.31326
STLA	.05522	-.17932	-.34078	-.17725	.08031
STPT	.12984	-.06848	-.02394	.80478	-.09270
SXY	-.37857	-.04436	-.07340	-.05673	-.05726
AEV	-.17520	-.01727	-.0407	.00737	-.06895
EMCL	.07416	-.01543	-.02741	-.07110	-.00501

	Factor 6	Factor 7	Factor 8	Factor 9	Factor 10
ASD	-.69313	-.08591	-.05297	.04823	-.05169
CBJ	-.00179	.00279	-.07084	.01336	-.02575
CELP	.09700	.04680	-.06989	-.01225	-.00582
CELT	.10877	.03806	-.00940	-.08832	-.03347
CXE	.04025	-.05471	-.04471	.03188	.00406

 FACTOR ANALYSIS

	Factor 6	Factor 7	Factor 8	Factor 9	Factor 10
ECO	.20910	-.10447	.09408	-.69589	-.12470
EFBE	.14260	-.20077	-.32328	.27252	-.46487
EFCL	.05425	.03257	-.08179	.07711	.22004
ENVER	.03739	-.13713	-.03565	.09165	.02451
ENSA	.09467	-.04185	-.13764	.12239	.85370
HAL	-.00576	-.07073	.10131	.01257	-.12236
KPW	.07161	-.03092	-.07211	.06925	-.05929
LCA	.06911	-.02290	-.02735	.07980	-.07290
LIN	-.02048	-.00199	-.11901	-.03066	.01141
MLU	.04505	-.03472	-.05711	.00717	.01704
SAUR	.23698	.53283	-.24354	.05418	.07714
SEPI	.26554	-.52923	.08984	.23275	-.02621
SLE	-.01067	-.00565	-.08448	-.75329	-.00160
SLE	.07962	.05617	.02886	.10364	-.03150
STAC	.04285	.00894	.38111	.06312	-.08168
STBO	.07943	-.04534	.78434	.04350	-.04288
STUY	-.07894	.00619	.10657	.18435	-.00508
STLA	.00144	.00874	.38144	-.02451	.46815
STFY	.01451	-.04065	.04051	.06592	-.04197
SXY	-.83923	.02141	-.01190	.03766	-.00538
LEV	.11444	-.04245	-.02235	-.01796	-.01197
ENCL	.01668	.00170	-.04480	.13003	-.06984

	Factor 11	Factor 12	Factor 13
ASO	-.02190	-.13256	-.02236
CBO	-.16044	.05360	-.00010
CELP	.04272	-.07476	-.00974
CELT	.01550	-.07740	-.02389
COE	.00552	-.04710	-.00017
ECO	.00962	-.28597	-.13105
EFBE	-.31457	-.00316	-.29908
EFCL	-.04028	.02502	-.05940
ENVER	.09430	-.05339	-.08525
ENSA	-.14041	.01518	-.12828
HAL	.01333	-.05417	.04625
KPW	-.04718	-.01546	.94268
LCA	-.10539	.12144	-.03639
LIN	.00965	-.00373	.02486
MLU	.18525	-.18273	-.03640
SAUR	.21744	-.05640	.03524
SEPI	-.08949	-.40097	.02240
SLE	-.11074	.11067	.01150
SLE	-.05694	-.10907	-.02792
STAC	-.06264	.03863	-.05851
STBO	-.05394	-.01175	-.07981

Factor 1	- 20917	- 07311	- 06672	- 02358	- 01915
Factor 2	- 05210	- 26396	- 15915	- 08166	- 09922
Factor 3	- 05815	- 35956	- 09541	- 01162	- 19106
Factor 4	- 36246	- 05383	- 40269	- 26900	- 14239
Factor 5	- 15966	- 09597	- 27129	- 05290	- 45712
Factor 6	- 34419	- 13768	- 14756	- 40912	- 35526
Factor 7	- 13637	- 27274	- 06928	- 04864	- 03362
Factor 8	- 08916	- 32647	- 08279	- 77773	- 04456
Factor 9	- 43246	- 48102	- 7573	- 13995	- 19512
Factor 10	- 07213	- 36867	- 65503	- 29267	- 41062
Factor 11	- 25791	- 26592	- 05831	- 00016	- 40824
Factor 12	- 01579	- 36740	- 02902	- 04700	- 39930
Factor 13	- 07045	- 15315	- 06289	- 11365	- 29222

F A C T O R A N A L Y S I S

	Factor 11	Factor 12	Factor 13
STDV	.31240	.14590	.04375
57LB	.35636	-.12777	.19911
57BY	-.01873	-.00647	-.02611
SN	.06655	.04050	-.03575
AVY	.17277	.79718	-.02343
EWL	.#1304	.12691	-.05113

Factor Transformation Matrix:

	Factor 1	Factor 2	Factor 3	Factor 4	Factor 5
Factor 1	.87983	.21566	.04232	.34411	.09277
Factor 2	-.24344	.02662	-.28294	.18849	.05337
Factor 3	-.04820	.42749	.63757	-.19717	-.36422
Factor 4	.15032	.08697	-.18977	-.56709	-.15291
Factor 5	-.17117	-.23545	-.00955	.61178	-.15116
Factor 6	.05965	.04285	.04075	-.22646	.72343
Factor 7	.21475	.05183	-.36468	-.00290	-.21637
Factor 8	-.08682	.00038	.07474	.18994	.46507
Factor 9	.17052	-.07629	.39767	-.06172	-.04480
Factor 10	-.02159	.12439	-.07913	.13029	-.11489
Factor 11	-.01820	.02164	.14068	-.02125	.29155
Factor 12	.05003	-.00748	.14603	-.04837	-.01356
Factor 13	.09461	.02664	-.06751	-.02689	.10514

Factor 6 Factor 7 Factor 8 Factor 9 Factor 10

----- FACTOR ANALYSIS -----

	Factor 11	Factor 12	Factor 13
Factor 1	-.00046	-.03532	-.05508
Factor 2	-.09797	-.02895	-.01751
Factor 3	.13836	.05452	.01206
Factor 4	.25962	-.17339	.05368
Factor 5	.35256	-.21011	.24830
Factor 6	.15161	.13295	.14891
Factor 7	.29195	.07458	.04909
Factor 8	.10767	.24568	-.05651
Factor 9	-.11352	-.12106	-.21323
Factor 10	-.13921	.31615	-.10264
Factor 11	-.30660	-.80944	.17945
Factor 12	.37438	.26200	.26932
Factor 13	-.69856	.64009	.60365

 FACTOR ANALYSIS

Analysis number 1 Listwise deletion of cases with missing values

Extraction 1 for analysis 1, Principal Components Analysis (PC)

Initial Statistics:

Variable	Communality	* Factor	Eigenvalue	Pct of Var	Cum Pct
ASO	1.00000	* 1	2.90437	24.2	24.2
CBO	1.00000	* 2	1.63595	13.6	37.8
ENYER	1.00000	* 3	1.30389	10.9	48.7
ECO	1.00000	* 4	1.22475	10.2	58.9
KPY	1.00000	* 5	1.07100	8.9	67.8
SABR	1.00000	* 6	.89730	7.5	75.3
SYBO	1.00000	* 7	.87870	7.3	82.6
STDY	1.00000	* 8	.72465	6.0	88.7
STPY	1.00000	* 9	.60940	5.1	93.7
CELP	1.00000	* 10	.45560	3.8	97.5
CELT	1.00000	* 11	.26602	2.2	99.8
SKY	1.00000	* 12	.02833	.2	100.0

PC extracted 5 factors.

VARIMAX rotation 1 for extraction 1 in analysis 1 - Kaiser Normalization.

VARIMAX converged in 7 iterations.

Rotated Factor Matrix:

	Factor 1	Factor 2	Factor 3	Factor 4	Factor 5
ASO	-.07265	-.02179	.71950	.03124	.02417
CBO	.15591	.86345	-.01497	-.05751	-.06038
ENYER	.74163	.17390	-.24478	-.02052	.01486
ECO	.05640	-.10374	-.25146	-.01567	.76831
KPY	-.11760	-.03283	-.26978	.14495	-.61188
SABR	.09719	-.19365	-.30391	.75352	-.04437
SYBO	-.10267	-.04367	-.28120	-.65852	.12473
STDY	.54093	-.24934	.07561	-.39980	-.38074
STPY	.12890	.84410	-.02048	-.02724	-.02979
CELC	.91448	.11212	-.11437	.18773	.08889
CELT	.90235	.14479	-.14573	.13108	.17302
SKY	-.11500	-.02325	.78131	-.03534	-.02828

Factor Transformation Matrix

	Factor 1	Factor 2	Factor 3	Factor 4	Factor 5
Factor 1	.90603	.32188	-.24138	.10676	.07885
Factor 2	-.08051	.76527	.51568	-.31657	-.20181
Factor 3	.40877	-.53463	.71166	-.16060	.12176
Factor 4	-.02167	.06119	.11557	.75628	-.63995
Factor 5	-.07117	.14201	.39372	.53950	.72711

Hoja 2.xls

Mues	Enfe	Celt	Eco	Saur	Sepi	Sxy	Stdy	Stbo	Stpy	Stia	Efcl	Efar	Obo	Ensa	Rgn	Sa	Hai	Aso	Lca	Stac	Mlu	Aev	Encl	Sle	Cae	Lin	Celp
Ep-1	10	1000	10	1	10	1	1	1	1	10	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	92
Ep-2	10	650	1	1	10	1	1	1	1	1	1	10	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	52
Ep-3	10	520	1	1	10	1	1	1	1	1	1	1	10	1	1	1	1	1	10	1	1	1	1	1	1	1	42
Ep-4	10	480	1	1	1	1	1	10	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	10	1	1	1	1	1	1	34
Ep-5	10	700	10	1	10	1	1	1	1	10	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	56
Ep-6	1	360	1	1	10	1	1	1	1	1	1	1	10	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	28
Ep-7	1	280	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	10	1	1	1	1	1	1	1	10	1	1	1	1	1	19
Ep-8	1	400	1	1	10	1	1	1	1	1	1	1	10	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	32
Ep-9	1	204	1	1	10	1	1	1	1	1	1	1	10	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	19
Ep-10	10	1220	1	1	1	1	10	1	1	10	1	1	1	1	1	1	1	1	1	10	1	1	1	1	1	1	116
Ep-11	10	796	10	1	1	1	1	1	1	10	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	64
Ep-12	10	1065	10	1	1	1	1	1	1	1	1	1	10	1	1	1	1	1	1	10	1	1	1	1	1	1	74
Ep-13	10	1126	10	1	10	1	1	1	1	1	1	1	10	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	102
Ep-14	10	900	1	1	10	1	1	1	1	10	1	1	1	1	10	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	70
Ep-15	10	970	10	1	10	1	1	1	1	10	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	62
Ep-16	10	1507	10	10	1	1	1	1	1	1	1	1	10	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	112
Ep-17	10	724	10	10	1	1	1	1	1	1	1	1	10	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	57
Ep-18	10	405	1	1	10	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	24
Ep-19	10	1205	1	10	10	1	1	1	1	1	1	1	10	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	113
Ep-20	10	136	1	1	10	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	10	1	1	1	1	1	1	1	14
Ep-21	10	158	1	1	1	10	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	11
Ep-22	10	460	1	1	10	1	1	1	1	1	1	1	10	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	26
Ep-23	20	456	1	1	10	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	29
Ep-24	20	1158	1	10	10	1	1	1	1	1	1	1	10	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	122
Ep-25	20	1906	1	10	1	1	1	1	1	1	1	1	10	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	222
Ep-26	20	1000	1	10	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	85
Ep-27a	20	1355	1	10	10	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	122
Ep-27b	20	1208	1	10	1	1	1	1	1	1	1	1	10	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	110
Ep-28	20	1806	1	10	1	1	1	1	1	1	1	1	10	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	164
Ep-29	20	924	1	10	1	1	1	1	1	1	1	1	10	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	65
Ep-30	10	350	10	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	58
Ep-31	10	360	1	1	10	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	31
Ep-32	10	750	1	1	1	10	1	1	1	1	1	1	10	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	66
Ep-33	10	800	1	1	1	10	1	1	1	1	1	1	10	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	68
Ep-34	10	300	1	1	10	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	27
Ep-35	10	700	1	1	1	10	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	45
Ep-36	10	900	1	1	1	10	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	10	1	1	1	1	1	1	1	71
Ep-37	10	825	1	10	1	1	1	1	1	1	1	1	10	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	69
Esc-1	40	696	1	1	10	1	1	1	1	1	1	1	10	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	47
Esc-2	40	2485	1	1	10	1	1	1	1	1	1	1	10	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	168
Esc-3	40	2655	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	10	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	249
Esc-4	40	2114	1	1	10	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	10	1	1	1	1	1	1	1	195
Esc-5	40	2904	10	1	10	1	1	1	1	1	1	1	10	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	219
Esc-6	30	2795	1	1	10	1	1	1	1	1	1	1	10	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	220
Esc-7	30	3005	1	1	1	1	1	10	1	1	1	1	1	10	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	241
Esc-8	30	3084	10	10	1	1	1	1	1	1	1	1	10	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	65
Esc-9	30	130	1	1	10	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	10	1	1	1	1	1	32
Esc-10	30	844	1	10	1	1	1	1	1	1	1	1	10	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	57
Esc-11	20	1787	10	1	1	1	1	1	1	1	1	1	10	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	126
Esc-12	20	640	10	1	1	1	1	1	1	1	1	1	10	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	70
Esc-13	20	381	10	1	10	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	27
Esc-14	20	1336	1	1	10	1	1	1	1	10	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	84
Esc-15	10	2794	10	10	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	159
Esc-16	10	1419	10	1	10	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	75
Esc-17	10	312	1	10	1	1	1	1	1	1	1	1	10	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	28
Esc-18	10	1300	1	10	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	104
Esc-19a	10	1080	10	10	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	86
Esc-19b	10	757	1	10	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	59
Esc-20	10	1338	1	10	1	1	1	1	1	1	1	1	10	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	120
Esc-21	10	756	1	10	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	59
Esc-22	10	1100	1	10	1	1	1	1	1	1	1	1	10	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	88
Esc-23	10	780	1	10	1	1	1	1	1	1	1	1	10	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	61
Esc-24	10	1200	10	10	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	94
Esc-25	10	400	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	30
Esc-26	10	1	10	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	75

Claves:

Enf.: N° de vacas enfermas totales de mamitis en ambos establos (multip. por 10)

Celt: N° de células somáticas totales

Celp: N° de células somáticas pico (PMN, linfocitos, macrófagos, ...)

**TABLA. DENOMINACION ESPECIFICA DE LAS ABREVIATURAS
UTILIZADAS EN LA HOJA DE CALCULO 2.XLS.**

Eco: *Escherichia coli*
Saur: *Staphylococcus aureus*
Sepi: *S. epidermidis*
Sxy : *S. xylosus*
Stdy: *Streptococcus dysgalactiae*
Stbo: *S. bovis*
Stpy: *S. pyogenes*
Stla: *S. lactis*
Efcl: *Enterococcus faecalis*
Efae: *E. faecium*
Cbo : *Corynebacterium bovis*
Ensa: *Enterobacter sakazakii*
Kpn: *Klebsiella pneumoniae*
Sli : *Serratia liquefaciens*
Hal : *Hafnia alvei*
Aso : *Aeromonas sobria*
Lca : *Lactobacillus casei*
Stac: *Streptococcus acidominimus*
Mlu : *Micrococcus luteus*
Aev : *Aerococcus viridans*
Encl: *Enterobacter cloacae*
Sle: *Staphylococcus lentus*
Cxe : *Corynebacterium xerosis*
Lin : *Listeria innocua*

HOJA3.XLS

N° muestra	Establo LSC	Establo LSC	000cél/ml	Establo LP	Establo LP	000 cél/ml
	SCC total	SCC pico		SCC total	SCC pico	
isc-1	696	47	lp-1	1000	92	
isc-2	2465	168	lp-2	650	57	
isc-3	2655	249	lp-3	520	42	
isc-4	2114	189	lp-4	480	34	
isc-5	2904	219	lp-5	700	56	
isc-6	2765	220	lp-6	350	28	
isc-7	3005	241	lp-7	280	19	
isc-8	3084	265	lp-8	600	32	
isc-9	130	32	lp-9	204	19	
isc-10	844	57	lp-10	1320	116	
isc-11	1787	126	lp-11	796	84	
isc-12	94	10	lp-12	1065	74	
isc-13	381	22	lp-13	1126	102	
isc-14	1336	84	lp-14	900	70	
isc-15	2784	159	lp-15	970	62	
isc-16	1419	75	lp-16	1507	112	
isc-17	319	28	lp-17	724	53	
isc-18	1300	104	lp-18	405	24	
isc-19a	1080	86	lp-19	1205	113	
isc-19n	757	59	lp-20	106	14	
isc-20	1338	120	lp-21	158	11	
isc-21	756	59	lp-22	460	39	
isc-22	1100	88	lp-23	456	29	
isc-23	780	61	lp-24	1168	122	
isc-24	1200	94	lp-25	1906	222	
isc-25	400	30	lp-26	1000	85	
isc-26	950	75	lp-27a	1355	122	
			lp-27n	1208	110	
			lp-28	1806	164	
			lp-29	924	65	
			lp-30	850	58	
			lp-31	400	31	
			lp-32	750	66	
			lp-33	800	69	
			lp-34	300	22	
			lp-35	700	45	
			lp-36	900	71	
			lp-37	825	69	

Establo LSC		Nº vacas total: 8
Mes del año	Nº vacas enfermas/mes	
Jun-94	4	
Jul-94	3	
Oct-94	2	
Nov-94	1	
Dic-94	1	
Ene-95	1	
Establo LP		Nº vacas total: 13
Mes del año	Nº vacas enfermas/mes	
Abr-94	1	
May-94	0	
Jun-94	1	
Jul-94	1	
Oct-94	1	
Nov-94	2	
Dic-94	2	
Ene-95	1	
Feb-95	1	