

## Estrategias de muestreo y epidemiología de patógenos para el diagnóstico de infección intramamaria en vacas lecheras

Sampling strategies and epidemiology of pathogens for diagnosis of intramammary infection in dairy cows

<sup>1</sup>Oliveira I., <sup>2</sup>Torres A., <sup>3</sup>Perazzo Y., <sup>4</sup>González Z., <sup>4</sup>Rodríguez-Guillén L.

<sup>1</sup>Núcleo "Dr. Héctor Ochoa Zuleta", DCV-UCLA, Área de Bromatología y Microbiología. <sup>2</sup>Área de Producción. Departamento de Producción Animal y Tecnología. DCV-UCLA. <sup>3</sup>Área de Microbiología e Inmunología Animal. Departamento de Salud Pública. DCV-UCLA. <sup>4</sup>Área de Microbiología, Higiene e Inspección de Alimentos de origen animal. Departamento de Salud Pública. DCV-UCLA. Telf. 0251-2592441. E-mail: lualkarodriguez@ucla.edu.ve

### RESUMEN

El objetivo de esta investigación fue comparar las estrategias de muestreo duplicadas, sucesivas y consecutivas para el diagnóstico de mastitis subclínica en vacas lecheras durante la lactancia. Muestras de leche de cada cuarto de la glándula mamaria fueron recolectadas en dos explotaciones comerciales del Municipio Jiménez del Estado Lara. Para el cultivo 0,01 mililitros de leche fueron inoculados en agar tripticasa soya con 5% de sangre de oveja y en agar MackConkey, utilizando asas calibradas estériles, con incubación por 48 horas a 37°C. El crecimiento bacteriano se registro a las 24 y 48 horas de incubación, las colonias bacterianas fueron contadas y registradas como unidades formadoras de colonias (UFC)/ml de leche. Adicionalmente se determinó el recuento de células somáticas (RCS) con el Fossomatic Minor®. La mejor concordancia más allá del azar ( $\kappa$ ) se obtuvo en el muestreo duplicado con la definición de infección intramamaria (IIM) 4 (0,94) e IIM5 (0,93), seguido por la IIM1 tanto en el muestreo duplicado (0,93) como en el sucesivo (0,93). De acuerdo a los resultados obtenidos entre la primera y la segunda muestra de cada cuarto y a la estrategia de muestreo empleada, se concluye que puede diagnosticarse infección intramamaria con una muestra simple cuando se aislan e<sup>n</sup> 100 UFC/ml de leche de patógenos mayores [tales como *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus* spp. y coliformes (*Escherichia coli*, *Enterobacter* spp., *Klebsiella* spp.)] o e<sup>n</sup> 500 UFC/ml de leche de patógenos menores (*Staphylococcus* coagulasa negativa y *Corynebacterium* spp.) con RCS >200.000 células/ml de leche.

Palabras clave: mastitis, infección intramamaria, recuento de células somáticas, kappa.

### ABSTRACT

The objective of this research was to compare the duplicate, successive, and consecutive sampling strategies, for the diagnosis of subclinical mastitis in dairy cows during lactation. Milk samples from each quarter of the mammary gland were collected from two commercial farms located at Jiménez County in Lara State. A 0.01 ml of milk was inoculated in trypticase soy agar with 5% sheep blood agar and MackConkey using sterile calibrated loops. The plates were incubated for 48 hours at 37°C and the bacterial growth was recorded after 24 and 48 hours of incubation. Colonies were counted and recorded as colony forming units (CFU)/ml milk. Additionally, somatic cell count (SCC) was determined with the Fossomatic Minor®. Analyses were performed using Stata 9.2 and Dag\_Stat. The best agreement beyond chance ( $\kappa$ ) was obtained in the duplicate sampling with the definition of intramammary infection (IIM) 4 (0.94) and IIM5 (0.93), followed by IIM1 in the duplicate sampling (0.93) as well as in the successive (0.93). According to the results obtained from the first and second samples of each quarter and the sampling strategy used, it is concluded that intramammary infection can be diagnosed with a simple sample when it is isolated e<sup>n</sup> 100 CFU / ml of milk for major pathogens [e.g. *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus* spp., coliforms (*Escherichia coli*, *Enterobacter* spp., *Klebsiella* spp.)] or e<sup>n</sup> 500 CFU / ml of milk with minor pathogens (Coagulase Negative *Staphylococcus* or *Corynebacterium* spp.), taking as cut-off point for SCC >200,000 cells / ml milk.

Key words: mastitis, intramammary infection, somatic cell count.

## INTRODUCCIÓN

La mastitis es una reacción inflamatoria de la glándula mamaria, debida principalmente a la entrada de microorganismos patógenos, usualmente bacterias, en la ubre de la vaca [1,2] y es considerada la enfermedad más costosa en rebaños lecheros, afectando la producción y la calidad de la leche [3]. La prevalencia de la mastitis subclínica, principal forma de mastitis en los rebaños lecheros, puede ir desde 20 al 50% [3,4]. En Venezuela, Aranguren [5] en el estado Lara, reporta prevalencia del 20% para *Str. agalactiae* y del 10% de *Staphylococcus coagulasa* negativa (SCN) en muestras de leche provenientes de bovinos con mastitis subclínica en el Municipio Jiménez. En el Zulia, Farías y col. [6] reportaron 40% para *Staphylococcus coagulasa* positiva (SCP) y 28% para SCN, en muestras provenientes de vacas en ordeño mecánico además del 40% de SCN y 20% de *Corynebacterium* spp. en muestras provenientes de vacas en ordeño manual, mientras que el grupo de Valero-Leal [7] pudo identificar *Str. agalactiae* (26%), SCN (23%), *Streptococcus* spp. (20%) y *S. aureus* (17%).

Identificación precisa del estado de infección intramamaria (IIM) es indispensable para el establecimiento de programas de control destinados a disminuir el impacto económico negativo que representa la enfermedad para los productores [8]. A la fecha los métodos de muestreo de leche más empleados para el diagnóstico de IIM han sido: *Duplicados*: lo que implica la recolección de muestras dobles en un solo ordeño, una inmediatamente después de la otra [9]. *Sucesivos*: donde las muestras son tomadas antes e inmediatamente después del ordeño [9] y, *consecutivos*: en el cual las muestras son tomadas por tres a cinco días seguidos, en diferentes ordeños [10,11].

Los métodos de muestreo antes mencionados, en combinación con los cultivos microbiológicos y el recuento de células somáticas (RCS), son utilizados para estimar la salud de la ubre, el estado de infección de los cuartos, la producción y la calidad de la leche [12,13,14]. Siendo la clave fundamental para entender el impacto de la mastitis el diagnóstico correcto de IIM durante la lactancia [15,16]. Es por ello, que se plantearon los siguientes objetivos: determinar cuál de las estrategias de muestreo (duplicado, sucesivo y consecutivo) sería la más apropiada para el diagnóstico de IIM durante la lactancia, comparar cinco definiciones de infección intramamaria de acuerdo al tipo y número de patógenos aislados, y determinar la eficacia de las estrategias de muestreo para el diagnóstico de IIM durante la lactancia.

## MATERIALES Y MÉTODOS

Muestras de leche de cada cuarto de la glándula mamaria fueron recolectadas de acuerdo a las recomendaciones del Consejo Nacional de Mastitis (NMC) [17] en dos explotaciones comerciales del Municipio Jiménez del Estado Lara. En una de las fincas ordeñaban 320 vacas, mientras que en la otra finca, al momento del estudio, se ordeñaban 440 vacas. Criterios de inclusión: vacas lactantes sin manifestaciones clínicas aparentes de enfermedad, en diferentes estadios de la lactancia. Criterios de exclusión: Vacas con manifestaciones de mastitis clínica. Las muestras fueron obtenidas antes y después del ordeño de la tarde, a lo largo de diez meses, entre Abril del 2010 y Febrero del 2011 para controlar el posible efecto de la época de lluvias y época de sequía sobre el nivel de infección.

De la población bajo estudio, se seleccionaron al azar 115 vacas, a las cuales se les extrajo 5 ml/muestra/cuarto, para un total de 5 muestras por vaca, lo cual hace un gran total de 2.300 muestras de leche de cuarto analizadas.

Las muestras de leche se mantuvieron en una cava con hielo y fueron inmediatamente refrigeradas entre 4 y 5° C y posteriormente fueron transportadas al laboratorio para su procesamiento. El diagnóstico microbiológico, se realizó en el Laboratorio de Microbiología del Decanato de Ciencias Veterinarias (DCV) de la Universidad Centroccidental "Lisandro Alvarado" (U.C.L.A.). La determinación del RCS se realizó durante las primeras 36 horas de obtenidas las muestras en el Laboratorio de Bromatología del DCV-U.C.L.A., inmediatamente después de realizar el cultivo microbiológico.

Las muestras de leche se examinaron microbiológicamente como lo recomienda el NMC [17], las colonias fueron contadas y registradas como unidades formadoras de colonias (UFC)/ml de leche. Todas las muestras con más de 2 tipos de colonias, se consideraron contaminadas [17] y fueron omitidas del análisis, al no poder determinarse el estatus bacteriológico definitivo de las mismas. Posteriormente, al concluir el análisis microbiológico, las muestras de leche fueron calentadas a 40°C ± 2°C por un máximo de 15 minutos, se homogeneizaron y se procesaron para el RCS en Fossomatic Minor®, como lo recomienda la Federación Internacional de Lecherías 1984 [18].

Para el análisis de los resultados obtenidos, las muestras recolectadas se evaluaron independientemente de acuerdo a la siguiente distribución:

**A. Muestras duplicados (MD):** dos muestras de leche recolectadas una inmediatamente después de la otra, de cada cuarto antes del inicio del ordeño a cada una de las vacas a muestrear (muestra 1 y 2); **B.**

**Muestras sucesivas (MS):** dos muestras de leche recolectadas inmediatamente antes y después del ordeño de cada cuarto a cada una de las vacas a muestrear (muestra 1 y 3); **C. Muestras consecutivas (MC):** una muestra de leche obtenida de cada cuarto antes del inicio del ordeño, durante tres días seguidos a cada una de las vacas a muestrear (muestra 1, 4 y 5).

De acuerdo a los resultados obtenidos en los cultivos microbiológicos y en el RCS de muestras de leche de cada cuarto, cinco definiciones de IIM fueron evaluadas de acuerdo, según publicación de Torres y col. 2009 [19], tal como se describe a continuación:

1) Aislamiento de e" 100 UFC/ml de leche de cualquier patógeno, con un RCS > 200.000 células/ml de leche (IIM1). 2) Aislamiento de e" 100 UFC/ml de leche de patógenos contagiosos mayores (*Staphylococcus aureus* y *Streptococcus agalactiae*) o e" 500 UFC/ml de leche de otros patógenos, con un RCS > 200.000 células/ml de leche (IIM2). 3) Aislamiento de e" 100 UFC/ml de leche de patógenos contagiosos mayores (*S. aureus* y *Str. agalactiae*) o e" 1.000 UFC/ml de leche de cualquier otro patógeno, con un RCS > 200.000 células/ml de leche (IIM3). 4) Aislamiento de e" 100 UFC/ml de leche de patógenos mayores [*S. aureus*, *Streptococcus* spp., *Enterococcus* spp., levaduras, *Trueperella pyogenes*, *Nocardia* spp., coliformes (*Escherichia coli*, *Enterobacter* spp., *Klebsiella* spp.) y otros patógenos Gram-negativos] o e" 500 UFC/ml de leche de patógenos menores, (*Staphylococcus coagulans* negativo (SCN) y *Corynebacterium* spp.) con un RCS > 200.000 células/ml de leche (IIM4). 5) Aislamiento de e" 100 UFC/ml de leche de patógenos mayores o e" 1.000 UFC/ml de leche de patógenos menores con un RCS > 200.000 células/ml de leche (IIM5).

Las diferentes definiciones de UFC/ml de leche se escogieron con el objetivo de ajustar la epidemiología de los microorganismos, cuando son usadas muestras individuales de leche para el diagnóstico de IIM.

**Estándar de oro:** Basadas en muestras pareadas, un cuarto se considero positivo si el mismo patógeno (e" a 100 UFC/ml de leche) era aislado en ambas muestras obtenidas del mismo cuarto (MD y MS) o en dos de las tres muestras obtenidas durante el MC de acuerdo a las recomendaciones del NMC [17].

**Análisis estadístico:** Para garantizar la independencia de los resultados obtenidos en los cultivos microbiológicos en cada una de las estrategias empleadas, se seleccionaron al azar 460 muestras del total de cuartos muestreados, 156 cuartos para el análisis del MD, 128 cuartos para el análisis del MS y 176 cuartos para el análisis del MC.

El nivel de concordancia entre el resultado microbiológico obtenido en muestras individuales (la

primera muestra de cada par del MD y MS o la muestra del primer día en MC) obtenidas de cada cuarto y los resultados obtenidos en la segunda muestra del mismo cuarto fueron calculadas independientemente en las tres estrategias de muestreo (tres análisis separados). El nivel de concordancia positivo y negativo [20] y su intervalo de confianza (IC) de 95% se calcularon como ha sido previamente descrito por Mackinnon [21].

Los cálculos del grado de concordancia más allá del azar (coeficiente *kappa*), con su IC de 95% para cada estrategia de muestreo [22] y el test de McNemar's  $\chi^2$  [23,24] fueron utilizados como ha sido descrito previamente por Torres y col. [19]. La medición de la eficacia para el diagnóstico de IIM fue evaluado utilizando parámetros de calidad como la sensibilidad, especificidad y eficiencia de las muestras de leche en comparación con el estándar de oro recomendado por Oliver y col. 2004 [17]. Eficiencia fue definida según Kraemer [25], como: [(número de verdaderos positivos + verdaderos negativos) / el total de número de muestras]. Los análisis estadísticos fueron realizados utilizando los paquetes estadísticos Dag\_Stat [21] y Stata™ 9.2 [26], como ha sido previamente descrito por Torres y col. [19].

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Del total de muestras analizadas se encontró crecimiento bacteriano en el 44,8% de las mismas con 3,7% (85/2.300) contaminadas. El 2,6% (60/2.300) de los cuartos de las 115 vacas muestreadas se encontraban atrofiados y el 48,9% (1.125/2.300) no presentaron crecimiento bacteriano.

Los patógenos más comunes en las MD y MS fueron los SCN (23,7% y 20,8%, respectivamente), seguidos por el *Corynebacterium* spp. (13,5% en MD y 15,3% en MS) y el *Str. agalactiae* (5,5% en MD y 5,1% en MS). Sin embargo, en las MC el patógeno predominante fue el *Corynebacterium* spp. (28,6%) seguido por los SCN (17,4%) y el *Str. agalactiae* (2,8%).

La presencia de patógenos menores puede deberse a que los mismos forman parte de la flora normal de la piel de cada cuarto de la ubre, lo que les permite colonizar el canal de pezón por largos periodos de tiempo [17,27]. Oliver y Mitchell [28], reportaron que pueden aislarse en los primeros días de lactación patógenos como los SCN, debido a que la glándula mamaria es más susceptible a IIM durante los primeros días de la lactancia.

La segunda muestra del MS presento los valores correspondientes al promedio de UFC/ml de leche (4.230 UFC/ml de leche) y mediana (2.000 UFC/ml de leche) más elevados con respecto a las otras muestras. Entre los patógenos aislados, el *Str. agalactiae* fue el que presentó el mayor recuento bacteriano, con una

IIM	Muestreo	% Concordancia	$\chi^2$ -P	Kappa
IIM1	MD	98,7 (95,5 – 99,8)	0,1573	0,93 (0,83 – 1,03)
	MS	93,8 (94,5 – 99,8)	1,0000	0,93 (0,83 – 1,03)
	MC <sup>2</sup>	96,6 (92,7 – 98,7)	0,0143	0,91 (0,83 – 0,98)
IIM2	MC <sup>3</sup>	95,4 (91,2 – 98,0)	0,0047	0,87 (0,78 – 0,96)
	MD	97,4 (95,4 – 99,3)	0,3173	0,87 (0,75 – 0,99)
	MS	98,5 (94,5 – 99,8)	0,1573	0,92 (0,82 – 1,03)
	MC <sup>2</sup>	92,6 (87,6 – 95,9)	0,0003	0,79 (0,68 – 0,89)
IIM3	MC <sup>3</sup>	90,9 (85,6 – 94,7)	0,0001	0,73 (0,61 – 0,85)
	MD	94,2 (89,3 – 97,3)	0,0196	0,85 (0,75 – 0,94)
	MS	96,1 (91,2 – 98,7)	0,6547	0,89 (0,79 – 0,98)
IIM4	MC <sup>2</sup>	89,7 (84,2 – 93,8)	0,0000	0,77 (0,67 – 0,87)
	MC <sup>3</sup>	85,1 (78,9 – 90,1)	0,0000	0,66 (0,54 – 0,77)
	MD	98,1 (94,5 – 99,6)	0,5637	0,94 (0,87 – 1,01)
	MS	96,1 (91,2 – 98,7)	0,1797	0,87 (0,77 – 0,98)
IIM5	MC <sup>2</sup>	93,7 (89,0 – 96,8)	0,0009	0,79 (0,68 – 0,91)
	MC <sup>3</sup>	92,6 (87,6 – 95,9)	0,0003	0,75 (0,62 – 0,88)
	MD	97,4 (93,6 – 99,3)	0,3173	0,93 (0,87 – 0,99)
	MS	95,4 (90,2 – 98,3)	1,0000	0,88 (0,78 – 0,97)
	MC <sup>2</sup>	94,9 (90,5 – 97,6)	0,0000	0,83 (0,72 – 0,94)
	MC <sup>3</sup>	92,6 (87,6 – 95,9)	0,0003	0,74 (0,61 – 0,87)

Tabla I. Porcentaje de Concordancia con Intervalo de Confianza del 95% (en paréntesis), Valor  $p$  de  $\chi^2$  cuadrado ( $\chi^2$ -P) de la prueba de McNemar, y Estadístico  $kappa$  entre los pares de muestras Duplicadas (MD; n=156 pares), Sucesivas (MS; n=129 pares) y entre la serie de Consecutivas (MC; n=518 muestras) usando 5 definiciones diferentes de Infección Intramamaria (IIM)<sup>1</sup>. <sup>1</sup>IIM1=aislamiento de e" 100 UFC/ml de cualquier patógeno, con un RCS > 200.000 células/ml de leche. IIM2=aislamiento de e"100 UFC/ml de patógenos contagiosos mayores (*Staphylococcus aureus* y *Streptococcus agalactiae*) o e"500 UFC/ml de otros patógenos, con un RCS > 200.000 células/ml de leche. IIM3 = aislamiento de e" 100 UFC/ml de patógenos contagiosos mayores (*S. aureus* y *Str. agalactiae*) o e" 1000 UFC/ml de cualquier otro patógenos, con un RCS >200.000 células/ml de leche. IIM4=aislamiento de e" 100 UFC/ml de patógenos mayores [*S. aureus*, *Streptococcus* spp., *Enterococcus* spp., levaduras, *Arcanobacterium pyogenes*, *Nocardia* spp., coliformes (*Escherichia coli*, *Enterobacter* spp., *Klebsiella* spp.) y otros patógenos Gram-negativos] o e"500 UFC/ml de otros patógenos menores, (Estafilococos coagulasa negativo (ECN) y *Corynebacterium* spp.) con un RCS > 200.000 células/ml de leche. IIM5=aislamiento de e"100 UFC/ml de patógenos mayores (como se indica arriba) o e" 1000 UFC/ml de patógenos menores (ECN y *Corynebacterium* spp.) con un RCS >200.000 células/ml de leche. <sup>2</sup> Muestra 1 vs. Muestra 4. <sup>3</sup>Muestra 1 vs. Muestra 5. \* Tabla de contingencia con celdas valor 0.

mediana de 10.000 UFC/ml de leche, con un mínimo y máximo de 900 UFC/ml de leche y 21.000 UFC/ml de leche, respectivamente.

En los muestreos de leche duplicados, sucesivos y consecutivos, los promedios totales del RCS más altos se observaron en la muestra 3 del MS (899.000,07 células/ml de leche), seguidos por la muestra 4 (492.000,15 células/ml de leche) y muestra 5 (490.000,31 células/ml de leche) también del MC.

Dohoo y col. [29], reportan que el RCS ha sido utilizado para diagnosticar vacas infectadas y no infectadas cuando se toman muestras de leche de cuartos. La Federación Internacional de Lechería [30], recomienda que para el diagnóstico de cuartos con IIM se emplee un punto de corte del RCS elevado [31]. En el presente estudio se empleo como punto de corte, para determinar la presencia de IIM, un valor >200.000 células/ml de leche, que es el valor comúnmente aceptado. Farias y col. [6], recomiendan utilizar valores de 300.000 y 500.000 células /ml de leche para diagnosticar IIM en un cuarto de la glándula mamaria, pero un punto de corte entre esos rangos clasificaría IIM debidas a patógenos menores como cuartos sin infección, y solo permitiría determinar IIM debidas a patógenos que realmente ocasionan incrementos marcados del RCS, tales como el *S. aureus* o *Str. agalactiae*, donde los RCS superan las 1.000.000 células/ml de leche [32]. Por tal motivo, diversos investigadores han reportado que tomar puntos de cortes de RCS sin realizar cultivos bacteriológicos para diagnosticar IIM puede arrojar falsos positivos o falsos negativos en los resultados del diagnóstico de IIM [15,33].

Los resultados de esta investigación confirman que la presencia de patógenos contagiosos mayores incrementan el RCS, ya que muestras de leche donde se aisló el *Str. agalactiae* presentaron el mayor RCS, con una mediana de 2.768.000,5 células/ml de leche en la tercera muestra, resultado que concuerda con lo que describen Schepers y col. [34] y Scaramelli y col. [35], donde los RCS más elevados se asociaron a la presencia de patógenos mayores. Los patógenos mayores generalmente producen daño en la glándula mamaria, con inflamación sustancial que se detecta por un incremento en el RCS, y habitualmente persisten en la ubre por extensos periodos de tiempo [36].

#### Porcentaje de concordancia y estadístico $kappa$ :

El MD presento el mayor porcentaje de concordancia entre la primera y la segunda muestra, cuando la definición de IIM empleada fue IIM1 (98,7%), IIM4 (98,1%), e IIM5 (97,4%), determinándose que existe mayor grado de acuerdo entre estas muestras al interpretar con exactitud el diagnóstico de IIM (Tabla I). Mientras que cuando se empleo el MS, la mayor concordancia se observó con la IIM2 (98,5%), e IIM3

Definición IIM	Tipo de Muestra	Sensibilidad	Especificidad	Eficiencia <sup>2</sup>
IIM1	MD	26,2 (13,9-42,0)	96,5 (91,3-99,0)	77,6 (70,2-83,9)
	MS	33,3 (13,3-59,0)	90,9 (84,1-95,6)	82,9 (75,3-88,9)
	MC	38,5 (27,7-50,2)	86,6 (78,2-92,7)	65,1 (57,6-72,2)
IIM2	MD	26,2 (13,9-42,0)	94,7 (88,9-98,0)	76,3 (68,8-82,7)
	MS	22,2 (6,4-47,6)	90,9 (84,1-95,6)	81,4 (73,6-87,7)
	MC	38,5 (27,7-50,2)	84,5 (75,8-91,1)	64,0 (56,4-71,1)
IIM3	MD	21,4 (10,3-36,8)	95,6 (90,1-98,6)	75,6 (68,1-82,2)
	MS	60,0 (32,3-83,7)	81,9 (73,6-88,6)	79,4 (71,3-86,1)
	MC	67,9 (56,4-78,1)	86,6 (78,2-92,7)	78,3 (71,4-84,2)
IIM4	MD	26,2 (13,9-42,0)	96,5 (91,3-99,0)	77,6 (70,2-83,9)
	MS	33,3 (13,3-59,0)	90,9 (84,1-95,6)	82,9 (75,3-88,9)
	MC	35,9 (25,3-47,6)	89,7 (81,9-94,9)	65,7 (58,2-72,7)
IIM5	MD	21,4 (10,3-36,8)	97,4 (92,5-99,5)	76,9 (69,5-83,3)
	MS	33,3 (13,3-59,0)	75,7 (66,6-83,3)	69,8 (61,1-77,5)
	MC	39,7 (28,8-51,5)	94,9 (88,4-98,3)	70,3 (62,9-76,9)

Tabla II. Sensibilidad, Especificidad, Eficiencia e Intervalo de Confianza del 95% (en paréntesis), para la primera muestra comparada con la segunda muestra del par en la estrategia de muestreo Duplicada (MD), Sucesiva (MS) y entre la serie Consecutiva (MC) usando 5 definiciones diferentes de Infección Intramamaria (IIM)<sup>1</sup>IIM1=aislamiento de e" 100 UFC/ml de cualquier patógeno, con un RCS > 200.000 células/ml de leche. IIM2=aislamiento de e"100 UFC/ml de patógenos contagiosos mayores (*Staphylococcus aureus* y *Streptococcus agalactiae*) o e"500 UFC/ml de otros patógenos, con un RCS > 200.000 células/ml de leche. IIM3 = aislamiento de e" 100 UFC/ml de patógenos contagiosos mayores (*S. aureus* y *Str. agalactiae*) o e" 1.000 UFC/ml de cualquier otro patógenos, con un RCS >200.000 células/ml de leche. IIM4=aislamiento de e" 100 UFC/ml de patógenos mayores [*S. aureus*, *Streptococcus* spp., *Enterococcus* spp., levaduras, *Arcanobacterium pyogenes*, *Nocardia* spp., coliformes (*Escherichia coli*, *Enterobacter* spp., *Klebsiella* spp.) y otros patógenos Gram-negativos] o e"500 UFC/ml de otros patógenos menores, (Estafilococos coagulasa negativo (ECN) y *Corynebacterium* spp.) con un RCS > 200.000 células/ml de leche. IIM5=aislamiento de e"100 UFC/ml de patógenos mayores (como se indica arriba) o e" 1.000 UFC/ml de patógenos menores (ECN y *Corynebacterium* spp.) con un RCS >200.000 células/ml de leche. El aislamiento del mismo patógeno (e" 100 UFC/ml) en ambas muestras de MD(n=155 pares de muestras) y MS (n=116 pares de muestras) o en dos de las tres muestras de MC (n=518 muestras), fue usado como el estándar de oro. <sup>2</sup>[(número de verdaderos positivos + verdaderos negativos)/el total del número de muestras].

(96,1%), y por último, la concordancia entre los pares de MC fue consistentemente la más baja, indistintamente de la definición empleada (Tabla I). Estos resultados indican que existe gran variación en los patógenos aislados de muestras de cuarto en días consecutivos, mientras que existe mayor acuerdo entre los resultados obtenidos de muestras recolectadas el mismo día. Sin embargo, podría esperarse que los resultados de muestras tomadas una inmediatamente después de la otra, como fue el caso del MD, presentasen mayor concordancia, al compararse con muestras tomadas antes y después del ordeño (MS), tal como se observó en el presente estudio.

La concordancia positiva más alta se presentó en el par de muestras del MD con la IIM5 (95,2%). La concordancia negativa fue mayor en el MD con la IIM1 (99,3%).

En el MD y MS los resultados de la prueba de McNemar <sup>2</sup> (Tabla I) fueron no significativos (P>0,05), para la comparación entre la primera y la segunda muestra indistintamente de la definición utilizada, lo cual concuerda con lo reportado por Torres y col. (2009) [19]. Este hallazgo, de acuerdo a Petrie y Watson 1999

[23], sugiere que las dos proporciones positivas obtenidas con la primera y segunda muestra al emplear estas estrategias de muestreo con todas las definiciones fueron iguales. Determinando de esta manera que las variables estimadas son independientes una de la otra, por lo que al tomar cualquiera de las dos muestras de leche (la primera o la segunda), puede obtenerse el mismo resultado al diagnosticar IIM en el cuarto de la vaca infectada. En el caso del MC, los resultados de dicha prueba fueron significativos, indicando que las proporciones de los resultados positivos difieren significativamente entre ellas, aunque se ajustó el número de UFC/ml de acuerdo al tipo de patógeno aislado en las muestras, por lo que no podemos interpretar correctamente los resultados obtenidos del análisis de concordancia.

Todas las definiciones de IIM fueron estadísticamente similares (Tabla I), en las diferentes estrategias de muestreo, ya que todos los IC de kappa se superponen, similares a los resultados reportados por Torres y col. [19], donde no se observaron diferencias significativas en los coeficientes kappa de la IIM2 a la IIM5. En la citada investigación, los

autores reportan que la IIM1 mostró la menor concordancia más allá del azar debido a que en dicha definición de IIM no se considero la epidemiología de los patógenos, mientras que en esta investigación aunque para IIM1 tampoco se consideró la epidemiología de los patógenos si se tenía el RCS, lo que permitió que la concordancia más allá del azar fuese similar con todas las definiciones empleadas, con el MD presentando la mejor concordancia.

### **Prevalencia, sensibilidad, especificidad y eficiencia:**

En el MC se obtuvo la mayor prevalencia aparente (24,4%) en la primera muestra, sin embargo fue menor a la prevalencia verdadera basado en el estándar de oro (44,9%), esto puede traer como consecuencia la probabilidad de obtener resultados falsos negativos debido a que la prevalencia aparente de este estudio fue menor que la prevalencia verdadera. En el MD el nivel de prevalencia aparente, calculado en base a la primera y la segunda muestra del par, fue aproximadamente similar en todas las definiciones, mientras que en MS con la segunda muestra se observó consistentemente una mayor prevalencia. Es importante resaltar que en la primera muestra del MD la prevalencia real (26,9%) fue superior a la calculada basados en muestras simples, mientras que el MS arrojó resultados de prevalencia aparente similar a la prevalencia real (13,9%) con todas las definiciones de IIM empleadas. Los resultados de la sensibilidad, especificidad y eficiencia se presentan en la Tabla II. La mayor sensibilidad se observó entre el par de MC empleando IIM3 (67,9%). Este resultado sugiere que existe mayor proporción de la enfermedad o que se pudo diagnosticar IIM en cuartos de la glándula mamaria cuando aplicamos esta definición de IIM a las muestras de leche tomando también en cuenta el punto de corte del RCS. En el caso de Torres y col. [14], la mayor sensibilidad la presentaron la IIM4 del MD (86,0%) y la IIM2 del MS (82,4%) respectivamente, mientras que en el presente estudio la mayor sensibilidad se presentó en el muestreo consecutivo (MC), estrategia de muestreo presente en este trabajo y no en el de Torres y col. [19]. Estas diferencias pueden deberse a que en el MC se toman tres muestras del mismo cuarto, diagnosticando la IIM si en dos de las tres muestras tomadas se aísla el mismo patógeno para considerar un cuarto de la glándula mamaria positivo a IIM [17]. Adicionalmente, en el presente trabajo se incluyó el RCS como condición para el diagnóstico de IIM, ya que RCS > 200.000 células/ml de leche indica un cuarto infectado lo cual redujo la cantidad de falsos negativos. El diagnóstico de IIM a partir de una muestra simple usando las IIM5 tuvo la especificidad más alta (97,4%) cuando se comparó con

el estándar de oro del MD. De acuerdo al estudio de Torres y col. [19], usando la definición IIM3 (aislamiento de e" 100 UFC/ml de patógenos contagiosos mayores o e" 1.000 UFC/ml de otros patógenos) se encontró la mayor especificidad de 98,7% y 95,5% en las estrategias de muestreo MD y MS, respectivamente. El incluir el RCS en el presente estudio permitió confirmar el diagnóstico de IIM, aunque la misma se debiera a patógenos menores. La mayor eficiencia (tasa correcta de clasificación) se obtuvo usando las definiciones IIM1 e IIM4 (82,9%) en la estrategia de muestreo MS, seguida por las definiciones IIM2 (81,4%) en la misma estrategia de muestreo (Tabla II). Al incluir el RCS como parte de la definición de IIM, la eficiencia fue menor a la observada por Torres y col. [19], quienes no emplearon el RCS en combinación con las diferentes combinaciones de UFC/ml y tipo de patógenos para proveer un diagnóstico preciso de IIM. Por tanto, cuando se incluye el RCS como indicador de IMI y se ajustan las UFC/ml de acuerdo al tipo de patógeno aislado en la muestra, un menor número de patógenos menores son necesarios para declarar la presencia de IIM en el cuarto de la glándula mamaria (IIM4).

### **CONCLUSIONES**

Los resultados del presente estudio indican que la concordancia entre la primera y segunda muestra del muestreo duplicado fue alta, cuando el número de UFC/ml de leche se ajustó para considerar la epidemiología de los microorganismos en combinación con el RCS, indicando que puede diagnosticarse IIM en muestras de cuarto de la glándula mamaria basados en muestras simples y que cuando se requieran tomar más de una muestra por cuarto la estrategia de muestreo duplicado es el más recomendable.

La estrategia de muestreo consecutiva permitió determinar el nivel de prevalencia verdadera de infección intramamaria en los animales muestreados, mientras que la estrategia de muestreo sucesiva fue inadecuada para determinar la prevalencia de infección intramamaria.

Las definiciones de infección intramamaria más eficientes fueron la número 1 y la número 4. Este hallazgo sugiere que la infección intramamaria en bovinos se puede diagnosticar usando un valor de corte de e" 100 UFC/ml de leche con cualquier patógeno, con un RCS > 200.000 células/ml de leche o que puede basarse en el aislamiento de e" 100 UFC/ml de leche para patógenos mayores o e"500 UFC/ml de otros patógenos menores, con un RCS > 200.000 células/ml de leche.

### **AGRADECIMIENTO**

Este estudio se llevó a cabo con financiamiento del CDCHT-UCLA.

## BIBLIOGRAFÍA

- [1] Jones JM, Bailey TI. Understanding the basic of mastitis. Virginia Cooperative Extension Publication 404-233 1998; 1-5.
- [2] Detilleux JC. Genetics factors affecting susceptibility of dairy cow to udder pathogens. *Vet Immunol Immunopathol* 2002; 88:103-110.
- [3] Gurjar A, Gioia G, Schukken Y, Welcome F, Zadoks R, Moroni P. Molecular diagnostics applied to mastitis problems on dairy farms. *Vet Clin North Am Food Anim Pract* 2012; 28: 565-76.
- [4] Mullen KA, Sparks LG, Lyman RL, Washburn SP, Anderson KL. Comparisons of milk quality on North Carolina organic and conventional dairies. *J Dairy Sci* 2013; 96:6753-62.
- [5] Aranguren A, Ortega A, Mendoza C, Delgado N. Efecto de la mastitis clínica y subclínica sobre la concentración plasmática de metabolitos, proteínas y albumina en hembras bovinas. *Zootecnia Tropical* 2009; 27 (1): 57-63.
- [6] Faria JF, Garcia A, D'Pool G, Valero K, Cagnaso M, Angelosante G. Detección de mastitis subclínica en bovinos mestizos doble propósito ordeñados en forma manual o mecánica. Comparación de tres pruebas diagnósticas. *Revista científica FCV-LUZ* 2005; 15 (2): 109-118.
- [7] Valero-Leal K, Valbuena E, Chacón F, Olivares Y, Castro G, Briñez W. Patógenos contagiosos y ambientales aislados de cuartos mamarios con mastitis subclínica de alto riesgo en 3 fincas del estado Zulia. *Rev Científica FCV-LUZ* 2010; 20 (5): 498-505.
- [8] Wilson DJ, González RN, Das HH. Bovine mastitis pathogens in New York and Pennsylvania: Prevalence and effects on somatic cell count and milk production. *J Dairy Sci* 1997; 80: 2592-2598.
- [9] Sears PM, Wilson DJ, Gonzalez RN. Microbiological results from milk samples obtained premilking and postmilking for the diagnosis of bovine intramammary infections. *J Dairy Sci* 1991; 74: 4183-4188.
- [10] Dinsmore RP, English PB, Gonzalez RN, Sears PM, Schulte HF. Evaluation of methods for the diagnosis of *Streptococcus agalactiae* intramammary infections in dairy cattle. *J Dairy Sci* 1991; 74:1521-1526.
- [11] Buelow KL, Thomas CB, Goodger WJ, Nordlund KV, Collins MT. Effect of milk samples collection strategy on the sensitivity and specificity of bacteriologic culture and somatic cell count for detection of *Staphylococcus aureus* intramammary infection in dairy cattle. *Prev Vet Med* 1996; 26:1-8.
- [12] Ruegg PL, Sekito L. Test characteristics and comparison of methods used to detect subclinical mastitis. Proceeding of the National Mastitis Council 43rd Annual Meeting. 2004, Feb 01-04; Charlotte, North Carolina, USA.
- [13] Piepers S, De Vliegher S, de Kruif A, Opsomer G. Evolution of quarter- milk somatic cell counts of dairy heifers in early lactation. Proceeding of The National Mastitis Council 46th Annual Meeting. 2007, Jan 21-24; San Antonio, Texas, USA.
- [14] Acuña CN, Chertcoff RE, De Luca J. Relation between the negative or positive bacteriology of *Staphylococcus aureus* and correspondent SCC in dairy cows of different number of lactations and in different moments of same lactation. Proceeding of The National Mastitis Council 41st Annual Meeting. 2002, Feb 03-06; Orlando, Florida, USA.
- [15] Hogan JS, Smith KL, Hoblet KH, Schoenberger PS, Todhunter DA, Hueston WD, et al. Field survey of clinical mastitis in low somatic cell count herds. *J Dairy Sci* 1989; 72: 1547-1556.
- [16] Torres AH, Rajala-Schultz PJ, DeGraves FJ, Hoblet K. Using dairy herd improvement records and clinical mastitis history to identify subclinical mastitis infections at dry-off. *J Dairy Research* 2008; 75: 240-247.
- [17] Oliver SP, Gonzalez RN, Hogan JS, Jayarao BM, Owens WE. Microbiological procedures for the diagnosis of bovine udder infection and determination of milk quality. 4 ed. NMC Verona WI USA. 2004.
- [18] Federación Internacional de Lechería. Bulletin N°168, Recommended methods for somatic cell counting in milk. ISSN 0250-5118 1984; 5-17.
- [19] Torres AH, Rajala-Schultz PJ, DeGraves FJ. Diagnosis of bovine intramammary infection at dry-off based on sampling strategy, epidemiology of pathogens and agreement beyond chance. *J Vet Diagn Invest* 2009; 21: 427-436.
- [20] Cicchetti DV, Freinstein AR. High agreement but low Kappa: II. Resolving the paradoxes. *J Clin Epidemiol* 1990; 43: 551-558.
- [21] Mackinnon A. A spreadsheet for the calculation of comprehensive statistics for the assessment of diagnostic test and inter-rater agreement. *Computers in Biology and Medicine* 2000; 30: 127-134.
- [22] Fleiss J. Statistical methods for rates and proportions. 2 ed. Wiley NY USA. 1981.
- [23] Petrie A, Watson P. Statistics for veterinary and animal science. Blackwell Science, Oxford United Kingdom. 1999.

[24] Dohoo IR, Wayne M, Stryhn H. Veterinary epidemiologic research. University of Prince Edward Island, Charlottetown Canada. 2003.

[25] Kraemer HC. Evaluating medical test: Objective and quantitative guidelines. SAGE publications Newbury Park, CA USA. 1992.

[26] StataCorp LP. College Station, TX USA. 2007.

[27] Philpot WN, Nickerson SC. Mastitis: El contra ataque una estrategia para combatir la mastitis. Babson Bros. Co. Naperville, IL USA. 1992.

[28] Oliver SP, Mitchell BA. Susceptibility of bovine mammary gland to infections during the dry period. J Dairy Sci 1983; 66: 1162-1166.

[29] Dohoo IR, Meek AH, Martin SW, Barnum DA. Use of total and differential somatic cell counts from composite milk samples to detect mastitis in individual cows. Can J Comp Med 1981; 45: 8-14.

[30] Federación Internacional de Lechería. Bulletin N°132, Laboratory methods for use in mastitis work. ISSN 0250-5118 1981; 3-27.

[31] Wilcox JC, Van Horn HH, Harris B, Head HH, Marshall SP, Thatcher WN, Webbs DW, Wing JM. Large Dairy Herd Management. University Presses of Florida Gainesville FL USA. 1978.

[32] Harmon RJ. Physiology of Mastitis and Factors Affecting Somatic Cell Counts. Symposium: mastitis and genetic evaluation for somatic cell count. J Dairy Sci 1994; 77: 2103-2112.

[33] Reneau JK. Effective Use of Dairy Herd Improvement Somatic Cell Counts in Mastitis Control. J Dairy Sci 1986; 69: 1708-1720.

[34] Schepers AJ, Lam TJ, Schukken YH, Wilmink JB, Hanekamp WJ. Estimation of variance components for somatic cell counts to determine thresholds for uninfected quarters. J Dairy Sci 1997; 80: 1833-1840.

[35] Scaramelli AM, Ferraro L, Troya H. Recuento electrónico de células somáticas aplicado a la detección de mastitis subclínica bovina en fincas lecheras de los Estados Aragua y Carabobo, Venezuela. Revista científica, FCV-LUZ 1999; 15 (6): 508-518.

[36] Reyher KK, Haine D, Dohoo IR, Revie CW. Examining the effect of intramammary infections with minor mastitis pathogens on the acquisition of new intramammary infections with major mastitis pathogens—A systematic review and meta-analysis. J Dairy Sci 2012; 95: 6483-6502.