

UNIVERSIDAD DE LAS PALMAS DE GRAN CANARIA

**DEPARTAMENTO DE PATOLOGÍA ANIMAL, PRODUCCIÓN ANIMAL,
BROMATOLOGÍA Y TECNOLOGÍA DE LOS ALIMENTOS**



TESIS DOCTORAL

**APORTACIONES AL DIAGNÓSTICO DE LAS MASTITIS
SUBCLÍNICAS EN LA AGRUPACIÓN CAPRINA CANARIA**

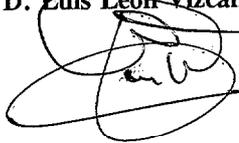
OTILIA ROSA FERRER QUINTANA

Las Palmas de Gran Canaria, 1994

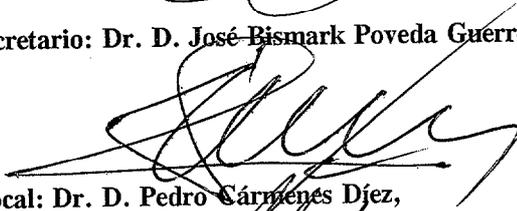
33-1993/94
UNIVERSIDAD DE LAS PALMAS DE GRAN CANARIA
UNIDAD DE TERCER CICLO Y POSTGRADO

Reunido el día de la fecha, el Tribunal nombrado por el Excmo. Sr. Rector Magfco. de esta Universidad, la aspirante expuso esta TESIS DOCTORAL.

Terminada la lectura y contestadas por la Doctoranda las objeciones formuladas por los señores jueces del Tribunal, éste calificó dicho trabajo con la nota de APTO CUM LAUDE
Las Palmas de G. C., a 7 de Abril de 1.994.
El Presidente: Dr. D. Luis León Vizcaino,



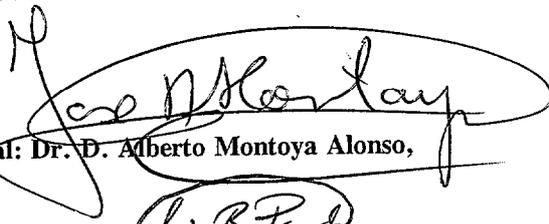
El Secretario: Dr. D. José Bismark Poveda Guerrero,



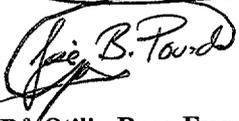
El Vocal: Dr. D. Pedro Cármenes Díez,



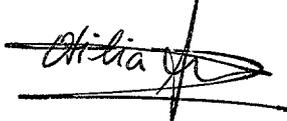
El Vocal: Dr. D. Antonio Contreras de Vera,



El Vocal: Dr. D. Alberto Montoya Alonso,



La Doctoranda: D^a Otilia-Rosa Ferrer Quintana,





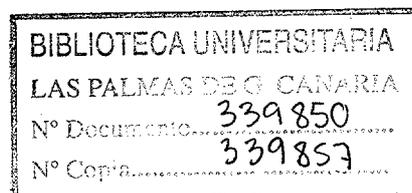
UNIVERSIDAD DE LAS PALMAS DE GRAN CANARIA

FACULTAD DE VETERINARIA

**DEPARTAMENTO DE PATOLOGIA ANIMAL, PRODUCCION
ANIMAL, BROMATOLOGIA Y TECNOLOGIA DE LOS ALIMENTOS**

**APORTACIONES AL
DIAGNOSTICO DE LAS MASTITIS
SUBCLINICAS EN LA
AGRUPACION CAPRINA CANARIA**

**OTILIA ROSA FERRER QUINTANA
Las Palmas de Gran Canaria, 1994**



UNIVERSIDAD DE LAS PALMAS DE GRAN CANARIA

DOCTORADO EN VETERINARIA

**DEPARTAMENTO DE PATOLOGIA ANIMAL, PRODUCCION
ANIMAL, BROMATOLOGIA Y TECNOLOGIA DE LOS ALIMENTOS**

**APORTACIONES AL
DIAGNOSTICO DE LAS MASTITIS
SUBCLINICAS EN LA
AGRUPACION CAPRINA CANARIA**

**Tesis Doctoral presentada por la
Licenciada en Veterinaria Dña.
Otilia Rosa Ferrer Quintana, para
optar al título de Doctora.**

Las Palmas de G. C. a 14 de Febrero de 1994

EL DIRECTOR



Fdo.: Dr. Fernando Real Valcárcel

DON FERNANDO REAL VALCARCEL, PROFESOR TITULAR DE ENFERMEDADES INFECCIOSAS, EPIZOOTIOLOGIA, MEDICINA PREVENTIVA Y POLICIA SANITARIA DEL DEPARTAMENTO DE PATOLOGIA ANIMAL, PRODUCCION ANIMAL, BROMATOLOGIA Y TECNOLOGIA DE LOS ALIMENTOS DE LA FACULTAD DE VETERINARIA DE LA UNIVERSIDAD DE LAS PALMAS DE GRAN CANARIA Y DIRECTOR DE LA TESIS DOCTORAL TITULADA "APORTACIONES AL DIAGNOSTICO DE LAS MASTITIS SUBCLINICAS EN LA AGRUPACION CAPRINA CANARIA", DE LA QUE ES AUTORA LA LICENCIADA EN VETERINARIA DOÑA OTILIA ROSA FERRER QUINTANA,

INFORMA

que dicha Memoria ha sido realizada por la mencionada Licenciada, bajo mi dirección y que cumple las condiciones exigidas por la legislación y normativas vigentes para optar al Título de Doctora en Veterinaria.

Las Palmas de C. C., a 14 de Febrero de mil novecientos noventa y cuatro.



A mis padres José y Remedios
A Jose Manuel

INDICE

INDICE

INDICE	1
II.- INTRODUCCION	11
II.- REVISION BIBLIOGRAFICA	14
II.1.- RESPUESTA INMUNE DE LA UBRE DE LOS RUMIANTES FRENTE A LA INFECCION	15
1.1.- BASES GENERALES	15
1.2.- INMUNIDAD HUMORAL	16
1.2.1.- ORIGEN DE LOS ANTICUERPOS EN LA SECRECION MAMARIA	16
1.2.2.- PRESENCIA DE ANTICUERPOS EN LA SECRECION MAMARIA	17
1.2.3.- INMUNIDAD LOCAL	20
1.2.3.1.- origen de las células que contienen IgA en la glándula mamaria	21
1.2.3.2.- Mecanismo de transferencia de las immuno- globulinas producidas localmente en la secreción mamaria	22
1.2.4.- EFECTOS INMUNOLOGICOS EN LOS PROCESOS DE MASTITIS	23
1.3.- INMUNIDAD CELULAR	26
1.3.1.- FAGOCITOSIS	29
1.3.1.1.- Quimiotaxis leucocitaria	29

INDICE

1.3.1.2.- Opsonización	29
1.3.1.3.- Ingestión	32
1.3.1.4.- Mecanismos microbicidas oxígeno- dependientes	32
1.3.1.5.- Sistemas oxígeno-independientes	33
1.4.- FACTORES QUE AFECTAN LA FUNCION FAGOCITICA EN LA LECHE	35
1.4.1.- CELULAS FAGOCITICAS	35
1.4.2.- CONCENTRACION DE OXIGENO	36
1.4.3.- FUENTE DE ENERGIA	37
1.4.4.- GRASA Y CASEINA	37
1.4.5.- OPSONINAS	38
II.2.- ESTUDIO DE LAS MASTITIS SUBCLINICAS EN EL GANADO CAPRINO	39
2.1.- IMPORTANCIA	39
2.2.- ETIOLOGIA	41
2.3.- EPIDEMIOLOGIA	44
2.3.1.- FACTORES QUE DEPENDEN DEL HOSPE- DADOR, AGENTE Y MEDIO AMBIENTE	44
2.3.1.1.- Hospedador	44
2.3.1.2.- Medio ambiente	45
2.3.1.3.- Agente	46

INDICE

2.3.2.- FUENTES DE INFECCION	47
2.3.3.- MECANISMOS DE CONTAGIO	48
2.4.- PATOGENIA	49
2.4.1.- FASE DE INVASION	49
2.4.2.- FASE DE DIFUSION	50
2.4.3.- FASE DE INFLAMACION	51
2.5.- LUCHA	52
2.5.1.- CONTROL	52
2.5.1.1.- Tratamiento	55
2.5.1.1.1.- Normas generales	55
2.5.1.1.2.-Fallos terapéuticos	58
2.5.1.2.- Inmunización	63
2.5.1.3.- Diagnóstico precoz de la infección mamaria	65
2.5.2.- POLICIA SANITARIA	67
2.5.2.1.- Medidas generales	67
2.5.2.2.- Higiene del ordeño	68
2.5.2.3.- Sacrificio de animales	72
II.3.- DIAGNOSTICO DE LAS MASTITIS SUBCLINICAS EN LOS RUMIANTES	75
3.1.- METODOS INDIRECTOS	75

INDICE

3.1.1.- PRUEBA DEL CALIFORNIA MASTITIS TEST .	75
3.2.- METODOS DIRECTOS	80
3.2.1.- MICROBIOLOGICOS	80
3.2.2.- RECUENTOS DE CELULAS SOMATICAS EN LECHE	84
3.2.2.1.- Composición celular de la leche	85
3.2.2.2.- Variaciones del contenido celular de la leche	87
3.2.2.3.- Método <i>Coulter-Counter</i>	91
3.2.2.4.- Método <i>Fossomatic</i>	95
3.3.- MEDICION DE LA RESPUESTA INMUNE EN LA UBRE DE LOS RUMIANTES	97
3.3.1.- INMUNIDAD HUMORAL	97
3.3.1.1.- Técnica de inmunodifusión radial	103
3.3.2.- INMUNIDAD CELULAR	107
III.- MATERIAL Y METODOS	108
III.1.- PROTOCOLO DE TRABAJO	109
III.2.- METODOS DE LABORATORIO	113
2.1.- RECOGIDA DE MUESTRAS	113
2.2.- CULTIVO BACTERIOLOGICO DE LA LECHE	113
2.2.1.- MEDIOS DE CULTIVOS	115

INDICE

2.2.1.1.- Agar sangre	115
2.2.1.2.- Medio de Hayflick modificado	116
2.3.- DETERMINACION DE UNIDADES FORMADORAS DE COLONIAS	117
2.3.1.- SOLUCIONES	118
2.3.1.1.- Solución salina fisiológica	118
2.4.- PRUEBA DE CALIFORNIA MASTITIS TEST	118
2.4.1.- FUNDAMENTO DE LA REACCION	118
2.4.2.- TECNICA DE LA REACCION	119
2.4.2.1.- Lectura de la reacción	120
2.5.- METODO COULTER-COUNTER	121
2.5.1.- FUNDAMENTO DEL METODO	121
2.5.2.- METODOLOGIA DE LA TECNICA EMPLEADA	122
2.5.2.1.- Calibración del aparato para el contaje celular de leche de cabra	123
2.5.2.2.- Estabilización de las muestras de leche	125
2.5.2.3.- Preparación de la muestra para el recuento	125
2.5.2.4.- Recuento celular	127
2.6.- FOSSOMATIC	128

INDICE

2.6.1.- FUNDAMENTO	128
2.6.2.- METODOLOGIA	129
2.6.3.- PREPARACION DE REACTIVOS	130
2.6.3.1.- Solución buffer	130
2.6.3.2.- Solución de tinción	130
2.6.3.2.1.- Solución de tinción concentrada	130
2.6.3.2.2.- Solución de trabajo	131
2.7.- INMUNODIFUSION RADIAL	131
2.7.1.- FUNDAMENTO	131
2.7.2.- OBTENCION DE ANTI-IgG DE CABRA	132
2.7.2.1.- Preparación del inóculo de IgG	132
2.7.2.2.- Protocolo de inoculación	133
2.7.3.- PREPARACION DE REACTIVOS	134
2.7.3.1.- Buffer de glicina	134
2.7.3.2.- EDTA ¹⁴ 0'4 M	134
2.7.3.3.- Agarosa al 2%	135
2.7.4.- PREPARACION DE LAS PLACAS DE DIFUSION	135
2.7.5.- ENSAYOS CON LOS SUEROS	136
2.7.5.1.- Obtención de la curva estándar de referencia	136

INDICE

2.7.5.2.- Cuantificación de sueros de cabras	137
III.3.- CALCULO DE LA SENSIBILIDAD Y ESPECIFICIDAD DE LAS TECNICAS EMPLEADAS	138
III.4.- METODOS ESTADISTICOS	139
IV.- RESULTADOS	141
IV.1.- EXPERIENCIA I	143
1.1.- ESTADO DE SALUD DE LAS GLANDULAS MAMARIAS DEL REBAÑO ESTUDIADO EN BASE AL CONTROL BACTERIOLOGICO	143
1.1.1.- RESULTADOS BACTERIOLOGICOS	143
1.1.2.- ETIOLOGIA DE LAS MASTITIS SUBCLINICAS EN LOS ANIMALES ESTUDIADOS	143
1.2.- EVALUACION DEL CONTAJE CELULAR EN LA LECHE DE LA CABRA CANARIA	144
1.2.1.- VALORES CELULARES FISIOLÓGICOS ...	144
1.2.2.- VALORES CELULARES EN LECHE DE CABRA CON MASTITIS SUBCLINICA	148
1.2.3.- VALORES DE SENSIBILIDAD Y ESPECIFICIDAD DE LAS TECNICAS EMPLEADAS	150
1.3.- ANALISIS ESTADISTICOS	150

INDICE

IV.2.- EXPERIENCIA II	154
2.1.- CONCENTRACION DE IgG EN LECHE DE CABRAS SANAS	154
2.2.- CONCENTRACION DE IgG EN LECHE DE CABRAS CON MASTITIS SUBCLINICAS	154
V.- DISCUSION	159
V.1.- EXPERIENCIA I	161
1.1.- ESTADO DE SALUD DE LAS GLANDULAS MAMARIAS DE LOS ANIMALES ESTUDIADOS EN BASE AL CONTROL BACTERIOLOGICO	161
1.1.1.- ETIOLOGIA DE LAS MASTITIS SUBCLINICAS EN EL GANADO CAPRINO ..	161
1.2.- EVALUACION DEL CONTAJE CELULAR EN LA LECHE DEL GANADO CAPRINO	165
1.2.1.- VALORES CELULARES FISIOLÓGICOS ...	165
1.2.2.- VALORES CELULARES EN LECHE DE CABRA CON MASTITIS SUBCLINICA	173
V.2.- EXPERIENCIA II	179
2.1.- CONCENTRACION DE IgG EN LECHE DE CABRAS SANAS	179
2.2.- CONCENTRACION DE IgG EN LECHE DE CABRAS CON MASTITIS SUBCLINICAS	181
VI.- CONCLUSIONES	185

INDICE

VII.- RESUMEN	189
VIII.- SUMMARY	193
IX.- BIBLIOGRAFIA	197
X.- TABLAS Y GRAFICOS	235
XI.- AGRADECIMIENTOS	277

I.- INTRODUCCION

INTRODUCCION

Las mastitis continúan siendo una de las causas más importantes de enfermedad y pérdidas económicas en la industria lechera, a pesar de la introducción de programas de control desde hace más de veinte años (DODD, 1983; CULLOR y cols., 1990; BLOOD y RADOSTITS, 1992).

La mastitis subclínica, cuya frecuencia es de veinte a cincuenta veces superior a la mastitis clínica, es hoy día el principal problema de todo el complejo patológico que representan las afecciones de la ubre. Además el 80 p. 100 de las pérdidas de la producción de leche son debidas a las mastitis subclínicas (BAXENDELL, 1985; KLEINSCHROTH y cols., 1989).

Al no ser detectadas estas infecciones subclínicas de la ubre constituyen un auténtico peligro para el estado sanitario de las ganaderías, ya que con la leche se eliminan bacterias que serán transmitidas a otros animales sanos a través de los utensilios de ordeño (MANSER, 1985; MILLER y BARLETT, 1991). Pueden convertirse en mastitis clínicas (agudas o crónicas). En ello estriba su importancia, junto al peligro que representa para la ganadería y la pérdida de producción lechera (DODD, 1983; CULLOR y cols., 1990; BLOOD y RADOSTITS, 1992). A estas pérdidas hay que añadir la baja calidad de la leche (KLEINSCHROTH y cols., 1989; MILLER y BARLETT, 1991).

La alteración en la baja calidad de la leche se debe principalmente a una variación en su composición. Las modificaciones cualitativas de la leche producidas por la mastitis se traducen en los análisis en un mayor contenido celular. La leche con alto contenido en células sufre un descuento en su valoración, por lo que, para los ganaderos, las mastitis se traducen en la práctica en un menor beneficio de las ventas (KLEINSCHROTH y cols., 1989; CULLOR y cols., 1990).

Sin duda, las mastitis representan para la Agrupación Caprina Canaria uno de los pilares básicos que suponen pérdidas económicas para las ganaderías y, posiblemente, de los problemas más desatendidos en cuanto a medidas de control se refiere. Debemos destacar que es la producción láctea la principal función de este colectivo.

No podemos olvidar que trabajar con animales con mastitis en su

INTRODUCCION

forma "subclínica" implica una doble dificultad: 1) la imposibilidad de reproducir artificialmente el citado cuadro y, 2) la posible reversibilidad que puede mostrar en el tiempo la infección evolucionando hacia formas clínicas agudas o crónicas, hacia la latencia o hacia la eliminación total de la infección. E insistimos, que siendo un cuadro que ronda los límites entre la salud y la enfermedad limita extraordinariamente la posibilidad de recoger los resultados esperados, dejando en muchos casos en manos del azar el fruto que vamos a obtener en nuestra investigación.

Atendiendo a las aseveraciones anteriormente expuestas hemos centrado nuestro trabajo en dos colectivos de la Agrupación Caprina Canaria situados en la Isla de Gran Canaria, y que obedecen en sus condiciones de explotación a las características que reúnen la mayoría de estos colectivos ganaderos de nuestro Archipiélago. Con esta premisa los objetivos que nos hemos fijado sobre estos dos rebaños son:

* Establecer los valores celulares fisiológicos en muestras de leche mediante *California Mastitis Test*, *Coulter-Counter* y *Fossomatic* considerando otros factores que puedan afectar a los mismos como la edad y el estadio de lactación de cada animal estudiado.

* Conocer las variaciones que se producen en dichos valores celulares a consecuencia de infecciones subclínicas de la ubre comparando las diferencias que acontecen con cada una de las etiologías implicadas.

* Cuantificar mediante inmunodifusión radial las modificaciones de los niveles de IgG en suero lácteo que se producen en animales exentos de infección subclínica a lo largo de una lactación.

* Investigar estos mismos niveles de IgG en animales con infección subclínica, atendiendo a las diversas etiologías presentes, evaluando así las posibilidades de la prueba como medida de control alternativa de las mastitis subclínicas en el ganado caprino.

II.- REVISION BIBLIOGRAFICA

II.1.- RESPUESTA INMUNE DE LA UBRE DE LOS RUMIANTES FRENTE A LA INFECCION.

1.1.- BASES GENERALES

El sistema defensivo de la glándula mamaria juega un importante papel antagonista en las infecciones. El pezón es la primera barrera frente a los microorganismos patógenos invasores (ADAMS y RICKARD, 1963; MCDONALD, 1975; SENFT y NEUDECKER, 1991). Varias características anatómicas y fisiológicas del canal de éste (diámetro de apertura, revestimiento de queratina, etc.) dificultan la penetración de microorganismos patógenos, (MCDONALD, 1975; NICKERSON, 1987; SENFT y NEUDECKER, 1991); por lo que cualquier anomalía de estas estructuras, predispone a la glándula mamaria a la infección (OPDEBEECK, 1982; TARGOWSKI, 1983; CULLOR y cols., 1990; SENFT Y NEUDECKER, 1991).

Una vez que los microorganismos atraviesan el canal del pezón, normalmente se enfrentan con los sistemas defensivos del hospedador (GRIEVE y MATTILA, 1989). Estos sistemas probablemente eliminan la mayoría de los agentes invasores (GUIDRY y cols., 1980; LASCELLES y cols., 1980; WATSON, 1980; TARGOWSKI, 1983; SENFT y NEUDECKER, 1991); pero una supresión temporal de éstos, condicionados por ejemplo por factores estresantes, predispone a la glándula mamaria a infecciones bacterianas.

Bajo estas circunstancias, los microorganismos, incluso los de baja virulencia, pueden vencer el sistema inmune y producir síntomas de mastitis. La reducción de efectividad del sistema inmune también puede determinar inflamaciones crónicas subclínicas (CRAVEN, 1983; CULLOR y cols., 1990; WATSON, 1992).

Este sistema inmunitario o defensivo, cuenta con distintos mecanismos, que si bien forman un todo, al menos desde el punto de vista teórico se

REVISION BIBLIOGRAFICA

clasifican en humorales y de base celular, y que a continuación consideramos.

1.2.- INMUNIDAD HUMORAL

Ya en 1892, **EHRlich** plantea la posibilidad de que la glándula mamaria sea capaz de producir anticuerpos, además de demostrar en animales de experimentación, que dichos anticuerpos eran capaces de pasar sin alterarse a través del tracto digestivo, siendo los responsables de la inmunidad pasiva de la progenie ante distintos agentes patógenos.

Esta teoría contó a partir de 1955, con el apoyo de autores como **PETERSEN y cols. (1963)** que comienzan a considerar a la mama como una "glándula endotelial exocrina" capaz de producir anticuerpos contra bacterias y virus.

A partir de entonces, son muchos los trabajos realizados en torno a la producción y origen de estos elementos defensivos, a partir de los que se han ido fraguando una serie de teorías que tratan de explicar los mecanismos que acontecen hasta que tiene lugar su presencia en la secreción láctea.

1.2.1.- ORIGEN DE LOS ANTICUERPOS EN LA SECRECIÓN MAMARIA

Todos estos trabajos, han ido confirmando que los anticuerpos que se encuentran en la leche, pueden proceder tanto del torrente sanguíneo, como tener un origen local, a partir de su producción por parte de células de naturaleza linfocitaria, localizadas en la submucosa de la glándula mamaria denominadas plasmocitos (**WATSON y LASCELLES, 1973; LASCELLES y MCDOWELL, 1974; AHLSTEDT y cols., 1975; LASCELLES, 1979; LARSON y cols., 1980; WATSON, 1980**).

Ambos orígenes parecen ser responsables de la presencia de los distintos tipos de inmunoglobulinas, que aparecen tanto en los calostros como en la leche (**BRAMBELL, 1970; BUTLER, 1974; HEMMING, 1976; LASCELLES y MCDOWELL, 1974**).

REVISION BIBLIOGRAFICA

La concentración de las mismas, se ven afectadas por factores como el estado de la lactación y la especie; es el caso de la IgG₁, que predomina en el calostro de los animales rumiantes (MURPHY y cols., 1964; KICKHOFEN y cols., 1968; BUTLER, 1969; MACH y PAHUD, 1971; LASCELLES y cols., 1980; TARGOWSKI, 1983), mientras que en el hombre y en conejos predomina la IgA (BUTLER, 1974; AHLSTEDT y cols., 1975). Por su parte las IgM se presentan en pequeñas cantidades en las secreciones lácteas de todas las especies (SPIEGELBERG, 1974; WATSON, 1980).

Esta concentración, y la proporción relativa de cada clase de estas inmunoglobulinas en las secreciones lácteas de una especie, indica la principal ruta de transferencia de inmunidad pasiva y el origen (humoral o local) de las mismas (BRAMBELL, 1970; BUTLER, 1974; HEMMINGS, 1976; WATSON, 1980).

La importancia relativa de cada uno de estos orígenes difiere ampliamente entre unas especies y otras (LASCELLES y cols., 1980; WATSON, 1980), y ayuda a explicar la fuente de inmunidad pasiva para los neonatos.

Así por ejemplo, mientras que en los rumiantes la transferencia de las inmunoglobulinas maternas ocurre exclusivamente vía calostrada (GUIDRY y cols., 1980; CAFFIN y cols., 1983; GUIDRY y MILLER, 1986; CAFFIN y POUTREL, 1988), en otras especies (humanos, conejos, etc.), dicha transferencia tiene lugar principalmente en el útero a través de la placenta (MORPHIS y GITLIN, 1970). Ambas rutas no son exclusivas, e incluso resultan igualmente operativas en otras especies (WATSON, 1980).

1.2.2.- PRESENCIA DE ANTICUERPOS EN LA SECRECIÓN MAMARIA

Independientemente de su origen, el paso de sustratos desde la sangre hacia la secreción láctea podría ocurrir tanto a través de las células del epitelio glandular (presumiblemente vehiculados en vesículas), como entre las uniones de éstas (LASCELLES y MCDOWELL, 1974; LASCELLES y cols., 1980).

Ante ambas posibilidades, existe por un lado la evidencia de que en

REVISION BIBLIOGRAFICA

la glándula mamaria, tanto durante la lactación normal como en la producción de calostros, tiene lugar el paso de grandes moléculas solubles en agua (de pesos moleculares próximos al de las proteínas séricas) hacia la secreción a través de las células, mucho mejor que a través de las uniones entre ellas (LASCELLES, 1979; LASCELLES y cols. 1980).

Esta evidencia podría quedar explicada desde el punto de vista morfológico gracias a los estudios de microscopía electrónica realizados por W. BARGMAN y WELSCH (1969), que describen la presencia de vesículas pequeñas que se originaban en el borde basal de las células del epitelio glandular, y que podían servir de transporte de las inmunoglobulinas hasta la luz de la glándula.

Estas observaciones se encuentran apoyadas por las realizadas más recientemente por G. I. SCHOEFL y LASCELLES (1974) que mediante el empleo de inyecciones subcutáneas de conjugados de peroxidasa y de ferritina sobre los lóbulos inguinales de las glándulas mamarias de ratones, observaron que de 1 a 3 horas después de la aplicación del material radiodenso, éste se localizaba en el lumen alveolar. Así mismo, dicho material aparecía en vesículas próximas a los bordes basal e intercelular de la célula y a diferentes niveles a través de la misma, incluyendo aparentemente algunas en el proceso de secreción hacia la luz alveolar (SCHOEFL y LASCELLES, 1974).

En los rumiantes la proporción de concentración de $IgG_1:IgG_2$ en los calostros sobrepasa a la proporción comparable en suero, y debido a la ausencia de producción local de IgG_1 , es evidente que está operando un mecanismo selectivo de transferencia de IgG_1 desde la glándula hacia la leche (DIXON y cols., 1961; FELDMAN, 1961; LASCELLES, 1969; LASCELLES y cols., 1980).

Esta sencilla hipótesis que justifica la transferencia selectiva, la cual se propagó ya hace algunos años es esencialmente correcta (MURPHY y cols., 1964; LASCELLES, 1969 y 1971; BRANDON y cols., 1971; SMITH y cols., 1971; SMITH y cols., 1972; KEMLER y cols., 1975; SASAKI y cols., 1977; LARSON, 1979; LASCELLES y cols., 1980).

Se sugería que la transferencia selectiva de IgG_1 requería la existencia de receptores específicos en la membrana basal o intercelular (HAMMER y cols., 1969; SASAKI y cols., 1977); la formación de vesículas de transporte

REVISION BIBLIOGRAFICA

a estos niveles contienen relativamente más IgG₁ que IgG₂ u otras proteínas del fluido intersticial.

Más adelante se propuso que las proteínas eran transportadas en vesículas a través de la célula sin degradarse y se secretaban hacia los alveolos sin pérdidas del material citoplásmico o de las membranas; teoría que ha sido firmemente establecida por numerosos autores (LASCELLES, 1971; BRANDON y cols., 1971; CRIPPS y cols., 1976; SASAKI y cols., 1976).

Esta hipótesis difería de la propuesta por BRAMBELL (1970) en sus planteamientos de transferencia selectiva de IgG a través de el endodermo de los sacos embrionarios de conejos y cobayas, del intestino de las ratas, y de la placenta en los humanos.

Esta hipótesis mantenía que las IgG junto con otras proteínas, se encapsulaban en vesículas pinocitóticas para el transporte celular. Las IgG luego eran atacadas por receptores específicos y cuando la vesícula de transporte se fusionaba con los lisosomas que contenían enzimas proteolíticas, las IgG se protegían de la degradación debido a la unión a los receptores, mientras que otras proteínas dentro de las vesículas se degradaban por acción de las enzimas (BRAMBELL, 1970).

El trabajo de algunos autores han indicado que el ritmo del transporte de inmunoglobulinas comienza a acelerarse 4 a 6 semanas antes del parto (LARSON, 1958; DIXON y cols., 1961); consiguiéndose el mayor grado de concentración justo antes o en el momento del parto, a partir del cual el grado de transporte declina rápidamente (GUIDRY y cols., 1980; GUIDRY y MILLER, 1986; CULLOR y cols., 1990). La transferencia selectiva de IgG₁ continúa durante la lactación pero más reducida (MACKENZIE y LASCELLES, 1968).

Parece ser que las concentraciones de estrógenos que se excretan en la orina de las vacas preñadas presentan una estrecha relación con la capacidad de las células secretoras para transportar IgG₁ (ERB y cols., 1968; HUNTER y cols., 1970).

1.2.3.- INMUNIDAD LOCAL

Al principio de los años cincuenta se publicaron diversos trabajos los cuales indicaban que las inmunoglobulinas que estaban presentes en la leche y calostros del vacuno lechero se sintetizaban localmente en la glándula mamaria (CAMPBELL y cols., 1950; PETERSEN y CAMPBELL, 1955).

Este concepto se encontró con diversas discrepancias al principio de los años sesenta con evaluación crítica de los datos y determinados experimentos (DIXON y cols., 1961; LASCELLES, 1963). De hecho los primeros estudios que demostraron la autenticidad de la magnitud de la inmunidad local de la glándula mamaria de los rumiantes fueron llevados a cabo por LASCELLES y cols. (1966).

Esto es lo que llevó a numerosos investigadores (LASCELLES y cols., 1966; OUTERIDGE y cols., 1968; MCDOWELL y LASCELLES, 1969 y 1971; MONTGOMERY y cols., 1974), a demostrar que la penetración de partículas o de antígenos solubles en el interior de la glándula mamaria de los rumiantes en determinados estados de la lactación inducía un aumento en la producción local de anticuerpos, los cuales persistían a través de la lactación subsiguiente. Otros autores han confirmado estos hallazgos en vacas y ovejas con una variedad de antígenos (PLOMMET, 1968; PORTER, 1968; WILSON, 1972; WILSON y cols., 1972; BENNELL y WATSON, 1979; LASCELLES y cols., 1980). Por medio de técnicas de inmunofluorescencia, LEE y LASCELLES (1970) establecieron las bases celulares de la inmunidad local en la glándula mamaria de los rumiantes.

En la glándula mamaria sana de los rumiantes hay una producción local muy pequeña de anticuerpos y solamente se encuentran un número trivial de células que contienen inmunoglobulinas en el tejido mamario (DIXON y cols., 1961; LEE y LASCELLES, 1970). Sin embargo este cuadro se puede modificar mediante la inmunización local de la glándula *pre-partum*, procedimiento el cual resulta con el secuestro de inmunocitos hacia el tejido mamario y un incremento sustancial en la secreción de anticuerpos, principalmente IgA, aunque también con algunas IgM (MCDOWELL y LASCELLES, 1969; LEE y LASCELLES, 1970; WATSON y LASCELLES,

1973).

En las secreciones mamarias se ha observado que la IgA secretora juega un importante papel antibacteriano (SHELDRAKE y cols., 1985). Aunque numerosos esfuerzos han sido dirigidos para conseguir protocolos exitosos para la inmunización para la glándula mamaria de los rumiantes (LASCELLES, 1970; LASCELLES y MCDOWELL, 1974) han sido muy escasos el incremento de las cantidades de anticuerpos IgA en la leche o del número de células específicas antigénicas capaces de producir IgA en el tejido de la glándula mamaria (SHELDRAKE y cols., 1985).

En la oveja tras una estimulación antigénica en el periodo de secado se produce una respuesta local de anticuerpos moderada, y en la vaca la respuesta parece ser menos pronunciada (LEE y LASCELLES, 1970; WATSON, 1980). En contraste, en primates y roedores el sistema de IgA local en la glándula mamaria se activa naturalmente y no requiere inmunización artificial (VAERMAN, 1970; MCDOWELL, 1973; AHLSTEDT y cols., 1975).

La mayoría de anticuerpos producidos localmente se han asociado con IgA en particular y con IgM, pero no así con IgG (Lascelles y McDowell, 1974; WATSON, 1980; OPDEBEECK, 1982; SHELDRAKE y cols., 1985).

1.2.3.1.- Origen de las células que contienen IgA en la glándula mamaria

Trabajando con muestras humanas y de roedores hay una creciente evidencia que sugiere que las células precursoras de IgA las cuales se localizan en la glándula mamaria se originan en las placas de Peyer (CRAIG y CEBRA, 1971; MONTGOMERY y cols., 1974; PIERCE y GOWANS, 1975; HUSBAND y cols., 1977; PARMELY y BEER, 1977; WATSON, 1980; BUTLER, 1981; OPDEBEECK, 1982).

Tal evidencia sugiere que los antígenos del intestino se transportan a través del epitelio que recubre las placas de Peyer hacia el tejido linfóide, resultando en la liberación de células de naturaleza linfocítica (linfoblastos) productoras de IgA hacia la linfa mesentérica (PIERCE y GOWANS, 1975;

HUSBANS y cols., 1977; OPDEBEECK, 1982).

Estas células entran en la circulación sanguínea y subsecuentemente salen de ella para entrar o localizarse en las áreas intersticiales de las zonas mucosas del organismo, especialmente en la lámina propia del intestino, pero también en la glándula mamaria (BROWN y cols., 1975; PARMELY y BEER, 1977; WATSON y HUSBAND, 1977; BIENENSTOCK y BEFUS, 1980; LASCELLES y cols., 1980; WATSON, 1980; BUTLER, 1981).

Aunque existen evidencias de la existencia de una selección de la población de linfocitos que se localizan en la glándula mamaria, los mecanismos por los cuales tiene lugar este proceso de selección permanecen sin aclarar (OPDEBEECK, 1982). Las características de la superficie de los linfocitos, la carencia de receptores del complemento, y la presencia de inmunoglobulinas en la superficie pueden comprender la selección de las células destinadas a la glándula mamaria (MCWILLIAMS y cols., 1975; ROUX y cols., 1977; HEAD y BEER, 1979; OPDEBEECK, 1982).

La conducción de linfocitos hacia la glándula mamaria también puede estar mediado por un código antigénico y puede estar inducido por diversas hormonas tales como el estrógeno, progesterona y prolactina (WEISZ-CARRINGTON y cols., 1978; HANSON y cols., 1979; OPDEBEECK, 1982).

Aunque se han conseguido considerables respuestas de anticuerpos IgA e IgM en las secreciones mamarias de rumiantes tras la penetración de antígeno varias semanas anteriores al parto (WATSON y LASCELLES, 1975), sin embargo los mecanismos por los cuales tales sistemas de inmunización resultan con una respuesta local de anticuerpos permanece sin resolver (WATSON, 1980; OPDEBEECK, 1982).

1.2.3.2.- Mecanismo de transferencia de las inmunoglobulinas producidas localmente en la secreción mamaria

Con las técnicas de microscopía inmunoelectrónica utilizadas por J. P. KRAEHENBUHL y cols. (1974 y 1975), se ha estudiado en conejos el transporte de IgA producidas localmente en los plasmocitos localizados

adyacentes a las células epiteliales secretoras.

El mecanismo preciso de transferencia de IgA dimérica producida localmente por las células plasmáticas de la submucosa hacia la secreción mamaria no ha sido aún determinado (LARSON y cols., 1980). Sin embargo, por analogía con el intestino (BROWN y cols., 1975; WATSON y HUSBAND, 1977), podría ser que las IgA se transportan en vesículas a través de las células desde la membrana basal o intercelular.

Las IgA tienen una elevada afinidad por los componentes secretores, los cuales se sintetizan en las células epiteliales y se pueden incorporar a la membrana basal e intercelular. De este modo los componentes secretores pueden actuar como receptores para las IgA como se ha observado que tiene lugar en los hepatocitos de ratas (SOCKEN y cols., 1979).

1.2.4.- EFECTOS INMUNOLOGICOS EN LOS PROCESOS DE MASTITIS

Varios factores afectan el transporte de inmunoglobulinas en la secreción mamaria, y en los procesos de mastitis es importante considerar uno de esos aspectos, o sea, los efectos de la inflamación (LASCELLES, 1979; LARSON y cols., 1980).

Mientras que la filtración de los constituyentes de la sangre puede ocurrir a través de la barrera mamaria en la glándula sana, parece ser que no ocurre así en situaciones anormales tales como en el stress intenso o en infecciones como en mastitis severas (MACKENZIE y LASCELLES, 1968; BUTLER, 1974; LINZELL y PEAKER, 1974; PITELKA, 1978). En mastitis severas puede ocurrir una ruptura de la barrera mamaria, permitiendo que los constituyentes de la sangre entren en las secreciones lácteas (LARSON y cols., 1980).

También puede ocurrir un mecanismo a la inversa, debido a una elevada presión intramamaria por el acúmulo de leche inducido por un estado de involución que fuerce a los constituyentes de la leche hacia el torrente sanguíneo (LINZELL y PEAKER, 1971; LINZELL y PEAKER, 1974; LASCELLES y LEE, 1978).

REVISION BIBLIOGRAFICA

Durante las primeras horas de un proceso inflamatorio agudo, tales como la infusión de endotoxina o alfa hemolisina estafilocócica, hay un marcado incremento en la concentración de las proteínas séricas, incluyendo las inmunoglobulinas, pero la transferencia selectiva de IgG₁ se inhibe (MACKENZIE y LASCELLES, 1968). Con otras palabras, el epitelio glandular pierde capacidad de restringir y discriminar la transferencia de proteínas desde el fluido intersticial hacia la leche. También se ha asociado una deficiencia selectiva de las IgG₂ con infecciones tales como las que suceden en el curso de las mastitis (NANSEN, 1972; MAZENGERA y cols., 1985).

Observaciones preliminares (LASCELLES, 1969) sugieren que de uno a dos días después de la infusión, cuando los síntomas de la inflamación aguda han remitido, pero la producción de leche aún se encuentra profundamente deprimida, la transferencia selectiva de IgG₁ realmente incrementada excede a aquellos niveles previos a la aplicación del proceso inflamatorio. Esencialmente conclusiones similares fueron obtenidas por HARMON y cols. (1976), quienes observaron que la IgG y la albúmina sérica se incrementaban dramáticamente durante la inflamación aguda inducida experimentalmente con *Escherichia coli* pero que la IgG permanecía elevada después de que la albúmina sérica retornara a la normalidad.

Las inmunoglobulinas G₂, a pesar de encontrarse en baja concentración, funcionalmente se muestran muy importantes. Estas inmunoglobulinas resultan ser la principal opsonina de la glándula mamaria (WATSON, 1976; HILL y cols., 1983; GUIDRY y MILLER, 1985; CAFFIN y POUTREL, 1988) y son citofílicas para los neutrófilos polimorfonucleares (WATSON y LASCELLES, 1973; MATHISON y cols., 1984; GUIDRY y MILLER, 1985) y para los macrófagos (DESIDERIO y CAMPBELL, 1980). Las IgG₂ son considerablemente más citofílicas que las IgG₁ e intensifican la fagocitosis (WATSON, 1976; OPDEBEECK, 1982) y la actividad fagocítica contra algunos microorganismos tales como los *Staphylococcus aureus* (WATSON, 1976; LASCELLES, 1979; GUIDRY y cols., 1980).

La penetración local de vacunas de *Staphylococcus aureus* muertos en el interior de la glándula preparturienta se sabe que induce una protección considerable frente a los estafilococos virulentos en la lactación subsiguiente (OUTTERIDGE y LASCELLES, 1967; DERBYSHIRE y SMITH, 1969; MCDOWELL y LASCELLES, 1971; MACDOWELL y WATSON, 1974). La

REVISION BIBLIOGRAFICA

naturaleza precisa de la protección que confiere la inmunización local de la glándula no está bien conocida, pero con estos procedimientos se consiguen niveles significativos de IgA sintetizada localmente en la leche a través de diversos mecanismos (WATSON, 1980).

Uno de estos mecanismos comprende la inhibición de la adhesión de los microorganismos invasores a las células epiteliales glandulares (WATSON, 1980; OPDEBEECK, 1982). La adhesión selectiva de las bacterias a las células del hospedador es uno de los primeros pasos en el establecimiento de infecciones en los tejidos mucosos (GIBBONS y VAN HOUTE, 1971; SAVAGE, 1972). La adhesión selectiva de los organismos al epitelio de la glándula mamaria de los rumiantes constituye un hecho importante de la virulencia y patogénesis de los organismos Gram-positivos productores de mastitis (FROST, 1975; FROST y cols., 1977).

Existen evidencias tanto para (FROST, 1975; FROST y cols., 1977) y contra (ANDERSON, 1978) la adhesión epitelial por los patógenos bacterianos de las glándulas mamarias como un primer paso crítico en la patogénesis de las mastitis. Si la adhesión es importante entonces la síntesis local de IgA podría jugar un papel de protección por interacción con la bacteria y por lo tanto obstruir este proceso (WATSON, 1980).

Alternativamente, algunos estudios han mostrado que las secreciones mamarias de glándulas inmunizadas localmente tienen realizadas sus capacidades de opsonización (MCDOWELL y LASCELLES, 1971; GUIDRY y cols., 1977). La producción local de inmunoglobulinas puede comprender una protección de la glándula mamaria frente a la infección por neutralización de las toxinas, ya que se ha reconocido que las toxinas bacterianas juegan un papel importante en las enfermedades de la glándula mamaria, particularmente en las mastitis estafilocócicas (ANDERSON, 1976; WATSON, 1980).

La opsonización de bacterias y la neutralización de toxinas constituyen funciones muy importantes en la protección de la glándula y estas funciones son principalmente debidas al isotipo IgG (NORCROSS, 1977; ANDERSON, 1978; WINTER, 1979; NEWBY y cols., 1982), la cual es la inmunoglobulina predominante en las secreciones lácteas de los rumiantes (NORCROSS, 1977; GUIDRY y cols., 1980; WATSON, 1980; CAFFIN y cols., 1983; GUIDRY y MILLER, 1986; CAFFIN y POUTREL, 1988).

REVISION BIBLIOGRAFICA

Otras funciones protectoras de la glándula mamaria comprende a la lactoferrina, la cual ejerce un efecto bacteriostático en determinadas bacterias tales como *Escherichia coli* que requieren hierro para su replicación (SMITH y SCHANBACHER, 1977). La acción combinada de anticuerpos específicos y lactoferrina insaturada realza los efectos bacteriostáticos de esta proteína (BULLEN y cols., 1972; ROGERS y SYNGE, 1978; SAMSON y cols., 1979; STEPHENS y cols., 1980).

El papel de los neutrófilos en la protección de la glándula mamaria está bien establecido (JAIN, 1976; WATSON, 1980). Los neutrófilos llegan a la secreción mamaria en gran cantidad en respuesta a una injuria inflamatoria y son generalmente considerados como los mediadores de la inmunidad no específica.

Sin embargo, en algunos trabajos se ha observado que los neutrófilos transportan anticuerpos citofílicos (IgG₂) sobre sus membranas celulares (WATSON, 1975; GUIDRY y MILLER, 1985). Además, con métodos apropiados de inmunización con vacunas estafilocócicas han resultado con la producción de anticuerpos IgG₂ citofílicos los cuales confieren a los neutrófilos un realzamiento en su capacidad de fagocitar y matar a los *Staphylococcus aureus* (WATSON, 1976; WATSON, 1980).

Es por ello, que la sinergia entre los anticuerpos citofílicos y los neutrófilos resulta con la participación como una célula efectora en una inmunidad específica (más que no específica) (WATSON, 1980).

1.3.- INMUNIDAD CELULAR

Hasta hace algunos años, era una creencia común (SCHALM y cols., 1971) que la leche de glándulas mamarias sanas bovinas en las primeras fases de la lactación, contenían predominantemente células epiteliales, y sólo algunos linfocitos y neutrófilos, mientras que otros tipos de leucocitos polimorfonucleares (basófilos, eosinófilos) y los macrófagos se observaban más raramente.

Según O. W. SCHALM y cols. (1971), las células epiteliales también predominaban en la secreción durante el periodo de secado; sin embargo, los

REVISION BIBLIOGRAFICA

leucocitos polimorfonucleares y los mononucleares (linfocitos y macrófagos) predominaban en las secreciones de las glándulas involucionadas.

Estudios más recientes con microscopía electrónica, han demostrado que del total de las células somáticas en leche las células epiteliales representan menos del 2 p. 100 (LEE y cols., 1980). Todas las demás células en la leche normal en los diferentes estadios de la lactación y en la involución, son en su origen leucocitos (JENSEN y EBERHART, 1975; LEE y OUTERIDGE, 1976; PAAPE y cols., 1980; MCDONALD y ANDERSON, 1981).

Durante la lactación (LASCELLES, 1978), las células linfoides no se observan con frecuencia en secciones del tejido mamario de ovejas y vacas, pero su concentración se incrementa progresivamente durante la involución, y en la glándula completamente involucionada, las células linfoides parecen ser más numerosas que otros tipos de células.

En la vaca (LEE y cols., 1980), cabra (WOODING y cols., 1970) y oveja (LEE y OUTERIDGE, 1976), aproximadamente el 98 p. 100 de las células encontradas en la leche normal son leucocitos. Sin embargo, en la cabra (PAAPE y cols., 1980; WOODING y cols., 1980) y en la oveja (SCHALM y cols., 1971) también se presentan en la leche partículas semejantes a células. Estas partículas que con frecuencia se identifican erróneamente como macrófagos o células epiteliales, pueden constituir el 60 p. 100 del total del "contaje celular" en la leche normal.

La proporción entre los diferentes tipos de células en la leche cambia drásticamente durante la inflamación (SCHALM y cols., 1971). Los leucocitos polimorfonucleares se incrementan en gran proporción en las mastitis y ocasionalmente pueden constituir el 90 p. 100 del total de las células somáticas en estos procesos. Sin embargo, en las mastitis crónicas se pueden incrementar el número de células mononucleares (SCHALM y cols., 1971; CRAVEN y ANDERSON, 1984).

Los leucocitos polimorfonucleares, linfocitos y monocitos emigran hacia el tejido mamario a través de los capilares, y luego pasan a través del parénquima y del epitelio alveolar o ductal hacia la leche (PAAPE y cols., 1979; CRAVEN, 1983; TARGOWSKI, 1983). Los leucocitos polimorfonucleares resultan de la mayor importancia en el mecanismo de

REVISION BIBLIOGRAFICA

defensa de la ubre de los rumiantes contra las bacterias invasoras (SCHALM y cols., 1976; HILL y cols., 1978; PAAPE y cols., 1979; NIEMIALTOWSKI y cols., 1988; GRIEVE y MATTILA, 1989).

Las variaciones en la rapidez y la magnitud de esta afluencia son los que determinan en gran parte el que cada animal pueda resistir o eliminar la infección (COHN, 1978; HILL, 1981; GRIFFIN, 1982; CRAVEN, 1983). La migración de polimorfonucleares al foco inflamatorio tiene lugar por quimiotaxis positiva, pero los factores que influyen en este proceso en la ubre de los rumiantes son escasamente conocidos (BRUECKER y SCHWARTZ, 1982; CARROLL y cols., 1982; GRAY y cols., 1982; CRAVEN, 1983).

Las células polimorfonucleares y los macrófagos poseen receptores Fc para las IgG y las IgM, así como para el complemento (GREWAL y cols., 1978; PAAPE y cols., 1979). Las bacterias son opsonizadas por estas inmunoglobulinas y el complemento puede atacar fácilmente a sus receptores sobre la superficie de las células fagocíticas. Estas células juegan un importante papel en la defensa de la glándula mamaria contra los patógenos invasores debido a su capacidad para fagocitar, y subsecuentemente, destruir los microorganismos (JONES y HIRSCH, 1971; GREWAL y cols., 1978; PAAPE y cols., 1979; TARGOWSKI, 1982; CRAVEN, 1983).

Los resultados de varias investigaciones han demostrado que los linfocitos de la leche son capaces de responder a la estimulación de antígenos específicos *in vivo* (TARGOWSKI y BERMAN, 1975; DeCUENINCK, 1979; TARGOWSKI y NONNECKE, 1982) y a mitógenos y antígenos específicos *in vitro* (SMITH y SCHULTZ, 1977; PARMELY y BEER, 1976).

La población de linfocitos de la leche está constituida por linfocitos "T", responsables de las reacciones inmunes mediadas por células (OGRA y cols., 1977) y por linfocitos "B" responsables de la producción de anticuerpos (CHANG y cols., 1981). La población linfocítica en la leche de los bovinos, está compuesta aproximadamente entre un 31-65 p. 100 de linfocitos "T" y entre un 22-42 p. 100 de linfocitos "B" (CONCHA y cols., 1978).

B. J. NONNECKE y HARP (1985), demostraron *in vitro* que los linfocitos procedentes de cuarterones infectados con *Staphylococcus aureus* mostraban una marcada depresión de su blastogénesis durante la infección; lo cual indica que la función linfocítica *in vivo* está comprometida, lo que

posiblemente contribuya a que se establezca la cronicidad de las mastitis estafilocócicas.

1.3.1.- FAGOCITOSIS

1.3.1.1.- *Quimiotaxis leucocitaria*

Los leucocitos polimorfonucleares y macrófagos son células altamente especializadas capaces de reconocer partículas extrañas. Estos fagocitos móviles encuentran su objetivo gracias a la quimiotaxis (KELLER y cols., 1975; GALLIN y cols., 1979).

El elemento quimiotáctico de mayor efecto del suero es un producto de la escisión de la fracción V del complemento denominada C5a (SHIN y cols., 1968). Este agente quimiotáctico activa la activación de neutrófilos, monocitos, macrófagos, eosinófilos y basófilos, aunque parece que dicha fracción no se libera en la glándula mamaria bovina (DeCUENINCK, 1979). Las linfoquinas también son quimiotácticas para polimorfonucleares neutrófilos, monocitos y linfocitos.

Además de estos factores quimiotácticos se considera algunos productos liberados por mastocitos y basófilos tisulares con antígenos o productos liberados tras la activación del complemento, además de algunos metabolitos producidos tras la oxigenación del ácido araquidónico. Otros agentes quimiotácticos pueden ser liberados tras la interacción de diversos fluidos biológicos con una gran variedad de sustancias como proteínas péptidos o polisacáridos (SNYDERMAN y GOETZL, 1981).

Todos estos factores son responsables de la movilización de las células fagocitarias hacia los tejidos dañados; en suma, la quimiotaxis juega un papel crucial en la puesta en contacto entre los leucocitos polimorfonucleares y monocitos con los agentes extraños iniciándose de ese modo el proceso de fagocitosis (TARGOWSKY, 1982).

1.3.1.2.- *Opsonización*

REVISION BIBLIOGRAFICA

La opsonización quizás sea la actividad biológica más importante desarrollada por las inmunoglobulinas de la glándula mamaria (TARGOWSKI, 1983); facilitando la fagocitosis de los macrófagos y leucocitos polimorfonucleares (MUELLER y cols., 1983).

Las inmunoglobulinas por sí solas, predominantemente las IgG, pueden opsonizar microorganismos por el hallazgo de antígenos específicos ubicados en la superficie bacteriana (JOKLIK y WILLET, 1976; TARGOWSKI, 1983). Los complejos antígeno-anticuerpos (complejos inmunes) normalmente reaccionan con el complemento en los fluidos corporales.

El complemento está constituido por una serie de proteínas que actúa recíprocamente en una cascada enzimática, y funciona como un efector inmune de la respuesta inflamatoria aguda (FONG y cols., 1971; KAKOMA y KINYAUJUL, 1974; GRANT, 1977; PANG y ASTON, 1977; LINSKOTT y TRIGLIA, 1980; TRIGLIA y LINSKOTT, 1980). El ataque de la primera de los 11 componentes del complemento inicia una cadena de reacciones que finalmente pueden opsonizar o matar a los microorganismos (OSLER, 1976; MUELLER y cols., 1983; TARGOWSKI, 1983).

El efecto bactericida de la unión del complejo complemento-anticuerpo depende del grosor de la pared celular bacteriana y de otros elementos estructurales (OSLER, 1976; DAVIS y cols., 1980; MUELLER y cols., 1983; TARGOWSKI, 1983). En general, la actividad bactericida es efectiva sólo frente algunas bacterias Gram-negativas pero es inefectiva frente a bacterias Gram-positivas. Por consiguiente, la actividad microbicida del sistema complemento-anticuerpo es limitado (OSLER, 1976; DAVIS y cols., 1980).

La adhesión de las inmunoglobulinas a las bacterias, o de éstas junto al complemento es esencial para que se desarrolle el proceso de opsonización (GRIFFIN, 1977; VERBRUGH y cols., 1980; MUELLER y cols., 1983). Las células fagocíticas poseen receptores Fc para las inmunoglobulinas, así como para el componente C3b del complemento (GRIFFIN, 1977; VERBRUGH y cols., 1980).

Durante la cascada del complemento, la fracción C3b ajusta la unión

de los anticuerpos a la superficie bacteriana; a la vez, mediante una vía alternativa los péptidoglucanos (VERBRUGH y cols., 1980; MUELLER) y endotoxinas pueden activar la reacción del complemento sin la participación de anticuerpos. No obstante, el análisis de la cinética de estos mecanismos ha revelado que la opsonización de los estafilococos es más rápida por la vía clásica de activación del complemento (VERBRUGH y cols., 1980; MUELLER y cols., 1983; TARGOWSKI, 1983).

La concentración de complemento en la leche bovina, suele ser bajo y dependiente de la lactación y del estado clínico de la mama (REITER, 1977; DeCUENINCK, 1979). La penetración en la mama de animales sanos de complejos inmunes donde se había fijado el complemento, ha resultado insatisfactorio para evitar la respuesta inflamatoria (DeCUENINCK, 1979; MUELLER y cols., 1983).

Esto indica una baja concentración del complemento en leche o bien, una incapacidad de activar la vía clásica (DeCUENINCK, 1979; MUELLER y cols., 1983). Los resultados sobre estudios *in vitro*, sugieren una deficiencia de las opsoninas lácteas (WISNIOWSKI y cols., 1965; MUELLER y cols., 1983), que puede ser mejorada por la adición de un suero inmune (NEWBOULD, 1970). En la leche hay varias proteínas inespecíficas con actividades bactericidas (REITER, 1977; WATSON, 1980; OPDEBEECK, 1982).

Por consiguiente, los organismos opsonizados con anticuerpos IgG, el complemento, o bien con ambos, anticuerpos y complementos pueden adherirse a los receptores Fc, C3b o a ambos de las células fagocíticas (UNKELESS y EISEN, 1975). En general, los receptores Fc de las células fagocíticas son los responsables de la adhesión y subsecuente ingestión de las partículas opsonizadas con IgG, mientras que los receptores C3b son los responsables principalmente de la adhesión pero no desencadenan la ingestión de las partículas opsonizadas con C3b (UNKELESS y EISEN, 1975).

Los macrófagos activados pueden ingerir partículas opsonizadas con los receptores C3b (GRIFFIN, 1982). La función de los receptores Fc, C3b o de receptores inespecíficos es independiente (SILVERSTEIN y cols., 1977; VERHOF y cols., 1977). Su función puede ser separadamente inhibida o activada por varios reactivos. Así como se ha observado con los receptores Fc de leucocitos de calostros humanos, los cuales se bloquean por lípidos y

REVISION BIBLIOGRAFICA

la fracción acuosa (suero) de las secreciones mamarias (KOHL y cols., 1980).

1.3.1.3.- Ingestión

La ingestión comienza una vez que se ha producido la adhesión de las partículas a la superficie de las células fagocíticas. La adhesión puede tener lugar respectivamente, bien por la acción de las opsoninas (IgG o C3b), o bien por partículas que atacan a los receptores Fc, C3b o receptores no específicos, de la superficie de las células fagocíticas (GALLIN y cols., 1979).

La fagocitosis es el principal mecanismo de defensa para la eliminación de la mayoría de los microorganismos, y es una función desarrollada tanto por los macrófagos como por los leucocitos polimorfonucleares (SCHALM y cols., 1975; REITER, 1976; HILL y cols., 1978; GOLDSTEIN y WEISSMAN, 1979; CRAVEN, 1983; CRAVEN y ANDERSON, 1984; CULLOR y cols., 1990).

Los fagocitos pueden ingerir una gran variedad de microorganismos; con frecuencia su ingestión va seguida rápidamente por la muerte intracelular de algunos microorganismos (SCHALM y cols., 1975; REITER, 1976; HILL y cols., 1978).

Diversas reacciones bioquímicas están interrelacionadas con la acción microbicida de los fagocitos. Según lo cual, se dividen en dos grupos, aquellos fagocitos cuyos procesos bioquímicos dependen del oxígeno para desarrollar su efecto microbicida (KLEBANOFF, 1968; BABIOR, 1978 y 1984; CULLOR y cols., 1990), y aquellos que pueden operar independientemente del oxígeno para llevar a cabo su actividad (LEHRER y cols., 1975; NORTH, 1978; CULLOR y cols., 1990).

1.3.1.4.- Mecanismos microbicidas oxígeno-dependientes

Coincidiendo con el proceso de ingestión, se produce un gran incremento del metabolismo oxidativo, el cual es llamado "explosión respiratoria" (BABIOR, 1978; CULLOR y cols., 1990). Los principales

mecanismos metabólicos de la explosión respiratoria están marcados por el incremento del consumo de oxígeno, producción de peróxido de hidrógeno, anión superóxido y oxidación de la glucosa. El propósito de esta explosión respiratoria es proveer una variedad de oxidaciones a los agentes microbicidas (BAINTON, 1972; BABIOR, 1978; CAPUCO y cols., 1986; CULLOR y cols., 1990).

Parece ser que es difícil evaluar la eficacia de estos agentes microbicidas, porque muchos factores desconocidos pueden interferir con sus actividades. Sin embargo, el hidrógeno peróxido es uno de los agentes oxidantes en los gránulos de los monocitos y neutrófilos con una actividad microbicida bien establecida (BABIOR, 1978; CAPUCO y cols., 1986).

La mieloperoxidasa en los gránulos de los fagocitos aumenta la actividad microbicida de peróxido de hidrógeno. Además la mieloperoxidasa cataliza la oxidación de diversos iones hálidos, consiguiendo que se incorporen en el interior de la pared celular bacteriana (BABIOR, 1978; CULLOR y cols., 1986).

Alternativamente, el sistema de la mieloperoxidasa transforma los grupos carboxilos de los aminoácidos de la pared celular bacteriana a aldehídos. De este modo, las bacterias son efectivamente destruidas por este sistema, a través tanto de los mecanismos alternativos antes mencionados, como por otros productos que resultan de esta reacción (BABIOR, 1978; CULLOR y cols., 1986).

1.3.1.5.- Sistemas oxígeno-independientes

Entre los sistemas oxígeno-independiente se encuentran: a) ácidos formados en los fagosomas, los cuales contribuyen fundamentalmente a la destrucción de los organismos sensibles a ácidos (REITER, 1978; CULLOR y cols., 1990); b) lactoferrina, la cual ejerce un efecto microbiostático por quelación del hierro requerido para el crecimiento microbiano (BULLEN y cols., 1972); c) lisozima, la cual digiere las paredes celulares bacterianas (GOUDSWAARD y cols., 1978; CARROLL, 1979), y d) proteínas catiónicas, las cuales participan en la destrucción microbiana (PADGET y HIRSCH, 1967; REITER, 1978; CULLOR y cols., 1990).

REVISION BIBLIOGRAFICA

La mayoría de las bacteria son destruidas rápidamente por las células fagocíticas utilizando estos mecanismos. Sin embargo, algunos microorganismos tales como *Mycobacterium tuberculosis*, *Brucella abortus*, *Listeria monocytogenes*, y *Staphylococcus aureus* pueden sobrevivir e incluso multiplicarse dentro de las células fagocíticas, pero pueden ser destruidos por macrófagos activados (NORTH, 1978; ADAMS, 1982; CULLOR y cols., 1990).

La activación de los macrófagos puede consumarse por la acción de las linfoquinas; los macrófagos activados poseen un incremento en el contenido de lisozimas, peróxido de hidrógeno, O₂ y otros productos que resultan en una eficiente actividad microbicida (COHN, 1978; ADAMS, 1982; CULLOR y cols., 1990).

El almacén de enzimas y proteínas que comprende la destrucción microbiana de los neutrófilos de los bovinos es marcadamente diferente al de otras especies (GENNARO y cols., 1983; BAGGIOLINI y col., 1985). Como los neutrófilos de muchas especies, los neutrófilos de los bovinos están equipados con dos grupos de gránulos los cuales la mayoría contienen enzimas hidrolíticas y mieloperoxidasa, y algunos contienen lactoferrina. Sin embargo, estas células también poseen una tercera población de gránulos los cuales son mayores y más numerosos que los otros dos tipos, por lo que ocupan el mayor compartimento de almacenaje de los neutrófilos de los bovinos (GENNARO y cols., 1983; BAGGIOLINI y col., 1985).

Estos gránulos poseen un contenido en lactoferrina y una amplia variedad de proteínas básicas las cuales muestran una actividad antibacteriana hacia cepas de *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus* (GENNARO y cols., 1983).

Esta actividad antimicrobiana de las proteínas básicas de los neutrófilos de los bovinos también se ha demostrado frente a diversos gérmenes como a diferentes especies de estafilococos, a *Streptococcus agalactiae* o hacia *Enterobacter aerogenes* (HIBBIT y cols., 1971; HAKAK-BERENJI y JAIN, 1983). Y más recientemente, MAYER y cols., (1986) utilizaron extractos ácidos de los gránulos de los neutrófilos bovinos para investigar la destrucción de los microorganismos patógenos de mastitis por mecanismos no-oxidativos de estos neutrófilos.

1.4.- FACTORES QUE AFECTAN LA FUNCION FAGOCITICA EN LA LECHE

1.4.1.- CELULAS FAGOCITICAS

Las células fagocíticas en la glándula mamaria pueden poseer un amplio rango de actividades fagocíticas y bactericidas. Esta actividad puede ser muy elevada o completamente inefectiva, hasta el punto de que algunas células pueden fagocitar pero no destruir microorganismos o incluso proteger a las bacterias de la acción bacteriostática de la leche (MELLY y cols., 1974; TARGOWSKY y BERMAN, 1976; PETERSON y cols., 1978; FOX y McDONALD, 1987; CULLOR y cols., 1990).

La respuesta de la glándula mamaria frente a la irritación o a la infección cuenta además de otros mecanismos, con el incremento de la diapedesis de los leucocitos sanguíneos. Por ejemplo, en la mastitis aguda hay un flujo masivo de polimorfonucleares neutrófilos hacia la glándula, leucocitos que no difieren morfológicamente de los encontrados habitualmente en la leche. No obstante, un estudio realizado por S. P. TARGOWSKI y NONNECKE (1982), sugiere que los leucocitos polimorfonucleares llegados desde la sangre difieren morfológicamente de los que aparecen en la leche. Esta idea se basa en el hecho de que el 50% de los leucocitos que aparecen en la leche normal, forman rosetas con eritrocitos sensibilizados de oveja, mientras que sólo el 10% de los leucocitos que aparecen en leche mastítica son capaces de desarrollar esta capacidad (TARGOWSKY y cols., 1982).

Los receptores de la fracción Fc y C3b de la superficie de los leucocitos juegan un importante papel en varias fases de la fagocitosis, como demuestra el hecho de que leucocitos polimorfonucleares o macrófagos con receptores alterados para la Fc y C3b son incapaces de eliminar los agentes patógenos en la glándula afectada (WATSON, 1976; WEISSMANN, 1983).

Del mismo modo, algunos productos que en principio pueden bloquear dichos receptores, pueden ser el origen de una serie de mecanismos de estimulación que determinan la liberación de enzimas y productos intracelulares en el medio extracelular. De hecho, esta liberación podría tener lugar fuera de la propia fagocitosis, siempre que se establezca interacción de

REVISION BIBLIOGRAFICA

complejos inmunes con los receptores que estamos considerando (GOLDSTEIN y WEISSMANN, 1979).

Los productos leucocitarios contribuyen de forma decisiva en la gravedad de la inflamación, gravedad que podría encontrarse aumentada por estímulos inespecíficos, y la liberación de enzimas lisosomiales, ácidos, hidrolasas y otros productos relacionados con los daños tisulares especialmente aquellos que se producen a partir de leucocitos destruidos (FANTONE y WARD, 1982; HARMON y HEALD, 1982; WARD, 1983; CAPUCO y cols., 1986).

La intervención de todos estos factores puede hacer que se produzca un trasiego continuo de células desde la sangre hasta estos tejidos dañados, que ante su activación y/o destrucción pueden ser responsables de nuevas movilizaciones desde el torrente sanguíneo (TARGOWSKI, 1983; CULLOR y cols., 1990).

No se sabe con exactitud si los leucocitos polimorfonucleares que aparecen en las secreciones de glándulas mamarias con inflamaciones crónicas, difieren, desde el punto de vista funcional, con la actividad de estos mismos leucocitos en la leche normal. Si bien se piensa que ante un continuo flujo de estos leucocitos desde la circulación, podría dar lugar a la presencia de formas inmaduras en las que la capacidad bactericida de las mismas podría resultar insuficiente para el control de agentes patógenos (SCHALM y cols., 1975).

1.4.2.- CONCENTRACION DE OXIGENO

El consumo de oxígeno se incrementa durante la actividad microbicida de la fagocitosis de los leucocitos polimorfonucleares y los macrófagos. Esta circunstancia resulta crítica a la hora de valorar la actividad fagocítica de los leucocitos *in situ*, de tal modo que los ambientes con una tensión de oxígeno baja dificulta de forma notable estas actividades (KLEBANOFF y HAMON, 1975; MAYER y BOURNE, 1988; CULLOR y cols., 1990).

Desgraciadamente en la leche los contenidos de oxígeno son ciertamente bajos (FRAYER, 1940), lo que hace, que la actividad

REVISION BIBLIOGRAFICA

microbicida de los fagocitos lácteos deban desarrollarse en condiciones de hipoxia o anoxia, con lo que su capacidad defensiva se encuentra gravemente mermada. Estas bajas concentraciones de oxígeno en la leche pueden ayudar a explicar la menor capacidad microbicida de estos fagocitos frente a los que aparecen en sangre, donde la concentración de oxígeno es cien veces mayor (LINZELL y PEAKER, 1975; HOHN y cols., 1976; MAYER y BOURNE, 1988; CULLOR y cols., 1990).

1.4.3.- FUENTE DE ENERGIA

La fagocitosis es un proceso energético dependiente. La quimiotaxis, la ingestión, así como la estimulación de los fagocitos determina un incremento del consumo de glucosa, y su oxidación vía hexosa-monofosfato, en la que la glucosa se oxida hasta pentosa con la liberación de CO₂. Lo mismo que ocurriera en el punto anterior, la leche no contiene suficientes concentraciones de glucosa que sirvan de fuente energética a los fagocitos (NEWBOULD, 1973; RUSSELL y cols., 1976; PAAPE y WERGIN, 1977; PAAPE y cols., 1979; TARGOWSKI, 1983; CULLOR y cols., 1990).

La lactosa sería el único carbohidrato capaz de suplir los requerimientos de estas células, pero éstas no disponen de vías metabólicas para hacerlo (CAPUCO y cols., 1986). Esto hace que las células sólo puedan disponer de sus propias reservas de glucógeno para desarrollar tal actividad. Por otro lado, algunos autores han demostrado que dichas reservas resultan inferiores (aproximadamente un 38%) a las que aparecen en las células sanguíneas, lo que contribuye a una inadecuada funcionalidad de los fagocitos en la ubre (NAIDU y NEWBOULD, 1973; NEWBOULD, 1973; PAAPE y WERGIN, 1977; GUIDRY y cols., 1980; PAAPE y cols., 1980b; CULLOR y cols., 1990).

1.4.4.- GRASA Y CASEINA

La ingestión de glóbulos grasos y caseína por parte de los leucocitos polimorfonucleares reduce su actividad microbicida y fagocítica (PAAPE y GUIDRY, 1977; PAAPE y cols., 1980b; OPDEBEECK, 1982; CULLOR y

REVISION BIBLIOGRAFICA

cols., 1990).

Los resultados de diversos estudios sobre la fagocitosis *in vitro* (PAAPE y cols., 1975; RUSSELL y REITER, 1975) han mostrado que los glóbulos de grasa inhibían la fagocitosis por: 1) La unión de la caseína a la superficie de los polimorfonucleares (RUSSELL y REITER, 1975) y 2) la pérdida de la membrana de los polimorfonucleares asociada con los seudópodos (WERGIN y PAAPE, 1977; WERGIN y PAAPE, 1978).

Además la grasa y la caseína parece ser que interfieren con la capacidad de los polimorfonucleares para destruir los estafilococos fagocitados (REITER y BRAMLEY, 1975; PAAPE y GUIDRY, 1977; FOX y McDONALD, 1988). Esta inhibición del sistema bactericida de los polimorfonucleares se ha atribuido a que la degranulación que se produce en estas células después de la ingestión de grasa y caseína (RUSSELL y cols., 1976; PAAPE y WERGIN, 1977) dejan menor número de gránulos que contienen las enzimas hidrolíticas necesarias para la destrucción de los estafilococos fagocitados.

1.4.5.- OPSONINAS

La leche contiene una baja concentración de inmunoglobulinas relacionadas con la opsonización (WISNIOWSKI y cols., 1965; NEWBOULD, 1970; RUSSELL y REITER, 1975), así como de complemento (REITER, 1977; BJÖRKSTEN y cols., 1979; DeCUENINCK, 1979; NIMIALTOWSKI y cols., 1988; CULLOR y cols., 1990).

Además un incremento de inmunoglobulinas en la leche resultante de una respuesta inflamatoria en al glándula mamaria no resulta necesariamente con un incremento de la opsonización (NEWBOULD, 1970; PAAPE y cols., 1975; GUIDRY y cols., 1980; FOX y McDONALD, 1988).

En suma, la carencia de fuentes energéticas, la interferencia con componentes lácteos y su insuficiente concentración en opsoninas demuestran que la leche no es un medio demasiado adecuado para que los fagocitos desarrollen la actividad que les es propia (TARGOWSKI, 1983; CULLOR y cols., 1990).

II.2.- ESTUDIO DE LAS MASTITIS SUBCLINICAS EN EL GANADO CAPRINO

2.1.- IMPORTANCIA

Las mastitis continúan siendo una de las causas más importantes de enfermedad y pérdidas económicas en la industria lechera, a pesar de la introducción de programas de control de las mastitis desde hace más de 20 años (DOBBINS, 1977; DODD, 1983; BUSWELL, 1989; HUTTON y cols., 1990; MILLER y BARLETT, 1991; BLOOD y RADOSTITS, 1992; WATSON, 1992).

La mastitis es una inflamación de la glándula mamaria. La enfermedad se puede presentar como mastitis subclínica, es decir, sin síntomas apreciables, o bien como mastitis clínica, con signos evidentes fisiopatológicos (ANDERSON, 1983; BAXENDELL, 1985; KLEINSCHROTH y cols., 1989; CULLOR y cols., 1990; MAISI y RIIPINEN, 1991; BLOOD y RADOSTITS, 1992).

La mastitis subclínica, cuya frecuencia es de 20 a 50 veces superior a la mastitis clínica, es hoy día el principal problema de todo el complejo patológico que representa la mastitis (BAXENDELL, 1985; CULLOR y cols., 1990). Además el 80 p. 100 de las pérdidas de la producción de leche son debidas a las mastitis subclínicas (DODD, 1983; KLEINSCHROTH y cols., 1989).

Esta estimación procede del hecho de que la glándula mamaria enferma presenta un producción de leche que es un 20 p. 100 menor que la de la glándula mamaria paralela sana (KLEINSCHROTH y cols., 1989). De ello resulta una pérdida anual de al menos 12.000 pesetas por cada mastitis subclínica. Las pérdidas totales en España achacables a este proceso alcanzan cientos de millones de pesetas (KLEINSCHROTH y cols., 1989).

A las elevadas pérdidas de la producción lechera hay que añadir la

REVISION BIBLIOGRAFICA

baja calidad de la leche (LINZELL y PEAKER, 1972; CRIPPS, 1986; EL-YAS y NASHED, 1988; KLEINSCHROTH y cols., 1989; MILLER y BARLETT, 1991).

La alteración en la calidad de la leche se debe principalmente a una variación en su composición. Así por ejemplo, el contenido de caseína, calcio y fósforo disminuye, mientras que aumenta el contenido de albúmina, cloro y sodio (INTERNATIONAL DAIRY FEDERATION, 1979; PETTERSEN, 1981).

Estas modificaciones se aprecian tanto en la secreción láctea alterada de un determinado animal como en la leche de aquellos animales con frecuentes mastitis subclínicas (LINZELL y PEAKER, 1972; SCHALM, 1977; BAXENDELL, 1985; MANSER, 1985).

Para las industrias lácteas estas alteraciones en la composición de la leche natural significan una gran dificultad en la preparación de la leche para el consumo así como una modificación del gusto y de la estabilidad (LINZELL y PEAKER, 1972; CRIPPS, 1986). Las modificaciones cualitativas de la leche producidas por la mastitis se traducen en los análisis en un mayor contenido celular (SCHALM, 1977; ANDERSON, 1983; O'BRIEN, 1982; CULLOR y cols., 1990). La leche con alto contenido en células sufre un descuento en su valoración, por lo que, para los ganaderos, las mastitis se traducen en la práctica en un menor beneficio de las ventas (KLEINSCHROTH y cols., 1989).

Los signos más importantes de las mastitis subclínicas son el aumento de este contenido celular de la leche y la presencia de microorganismos causales en la ubre. Esta forma de mastitis se comprueba mediante examen del contenido celular y el estudio bacteriológico (EAST y cols., 1987; MANSER, 1985; KLEINSCHROTH y cols., 1989; CULLOR y cols., 1990; BLOOD y RADOSTITS, 1992).

Las mastitis subclínicas al no ser detectadas constituyen un auténtico peligro para el estado sanitario de las ganaderías, ya que con la leche se eliminan bacterias que serán transmitidas a otras cabras sanas a través de los utensilios de ordeño (MANSER, 1985; EL-YAS y NASHED, 1988; MILLER y BARLETT, 1991; BLOOD y RADOSTITS, 1992).

REVISION BIBLIOGRAFICA

Las mastitis subclínicas pueden convertirse en mastitis clínicas (agudas o crónicas). En ello estriba su importancia, junto al peligro que representa para la ganadería y la pérdida de producción lechera (DODD, 1983; CRIPPS, 1986; KLEINSCHROTH y cols., 1989; CULLOR y cols., 1990; BLOOD y RADOSTITS, 1992).

Las mastitis clínicas ocasionan también importantes daños económicos, que se derivan de: (1) la alteración o incluso pérdida total, pasajera o permanente, de la secreción láctea del animal, (2) la imposibilidad de distribución de la leche durante la enfermedad y el tiempo de la eliminación del medicamento tras el tratamiento, (3) los costes del tratamiento, (4) la menor productividad al tener que prescindir de animales por falta de curación y bajo rendimiento, (5) la sobrecarga de trabajo por los mayores cuidados que los animales requieren (DODD, 1983; CRIPPS, 1986; KLEINSCHROTH y cols., 1989; CULLOR y cols., 1990; BLOOD y RADOSTITS, 1992).

Las pérdidas totales por mastitis clínicas se desconocen al no existir estudios fiables sobre la frecuencia de esta forma de enfermedad. Se calcula que las pérdidas son similares a las ocasionadas por las mastitis subclínicas (CRIPPS, 1986; KLEINSCHROTH y cols.; 1989).

Las pérdidas que el conjunto de enfermedades que forman la mastitis ocasionan a los productores de leche de la antigua República Federal Alemana alcanzan anualmente una cifra estimada en unos mil millones de marcos (KLEINSCHROTH y cols.; 1989). En los Estados Unidos se ha considerado la mastitis como una de las enfermedades más costosas que afectan al vacuno lechero (BLOSSER, 1979; MILLER y DORN, 1990; MILLER y BARLETT, 1991).

2.2.- ETIOLOGÍA

La causa inmediata de la aparición de una mastitis es la infección de la ubre por microorganismos patógenos específicos (MANSER, 1985; EL-YAS y NASHED, 1988). El riesgo de infección se acrecienta con la intensa proliferación de la bacteria en el medio ambiente (KLEINSCHROTH y cols., 1989; CULLOR y cols., 1990).

REVISION BIBLIOGRAFICA

Se han asociado una amplia variedad de microorganismos en las mastitis tanto clínicas como subclínicas del ganado caprino (SMITH y ROGUINSKY, 1977; MANSER, 1985; EL-YAS y NASHED, 1988; BUSWELL y cols., 1989; MAISI y RIIPINEN, 1991).

Aunque *Staphylococcus aureus* es el microorganismo patógeno que más frecuentemente se asocia con las mastitis caprinas (SMITH y ROGUINSKY, 1977; THORNTON, 1983; HUNTER, 1984; LERONDELLE, 1984; BAXENDELL, 1985; MANSER, 1986; HARVEY y GILMOUR, 1988) las mastitis producidas por *Staphylococcus spp.* coagulasa-negativos ocurren más frecuentemente en las cabras que en las vacas y ovejas (MANSER, 1985; DE BUYSER y cols., 1987; EAST y cols., 1985; PERNTHANER y cols., 1991).

Además, están considerados por numerosos autores como los microorganismos de mayor prevalencia en la ubre caprina (ROGUINSKY y cols., 1971; PETTERSEN, 1981; SHELDRAKE y cols., 1981, LERONDELLE y POUTREL, 1984; HUNTER, 1984; MANSER, 1986; KALOGRIDOU-VASSILIADOU, 1991; MAISI y RIIPINEN, 1991; KALOGRIDOU-VASSILIADOU y cols., 1992).

La importancia de las infecciones debida a los *Staphylococcus spp.* coagulasa-negativos como microorganismos patógenos en la ubre caprina ha sido debatido por diversos investigadores. M. PEREZ y SCHULTZ (1979), K. E. PETTERSEN (1981) y R. F. SHELDRAKE y cols. (1981) no observaron diferencias significativas entre los contajes celulares realizados de ubres infectadas con *Staphylococcus spp.* coagulasa-negativos y de ubres libres de infección, mientras que R. MELLEBERGER (1979), B. POUTREL y LERONDELLE (1983) y D. KALOGRIDOU-VASSILIADOU y cols. (1992) hallaron diferencias significativas entre ambos contajes.

En determinadas ocasiones se ha descrito una irritación severa de la ubre y depresión en la producción de leche en mamas que albergaban estafilococos coagulasa-negativos (HOLMBERG, 1973; SMITH y ROGUINSKY, 1977; HINCKLEY y cols., 1985). Esto sugiere que las diferencias en las propiedades patogénicas pueden estar relacionadas con la presencia de determinadas especies bacterianas y/o determinadas cepas en la ubre (PETTERSEN, 1981; POUTREL, 1984).

Es por ello, que diversos autores consideran a los estafilococos coagulasa-negativos patógenos genuinos de las ubres caprinas (ROGUINSKY y cols., 1971; HOLMBERG, 1973; SMITH y ROGUINSKY, 1977; KALOGRIDOU-VASSILIADOU, 1991).

M. L. DE BUYSER y cols. (1987) aislaron enterotoxinas producidas por *Staphylococcus aureus* aislados de leche de cabra. Además, otras especies de estafilococos aparte de los *Staphylococcus aureus* pueden producir enterotoxinas (HOOVER y cols., 1983), las cuales también poseen un riesgo para la salud pública.

La baja prevalencia de infecciones por *Streptococcus spp.* recogida por diversos autores (HUNTER, 1984; BAXENDELL, 1985; MANSER, 1986; EAST y cols., 1987; KALOGRIDOU-VASSILIADOU, 1991) ha sugerido que en determinados países este género tiene poco significado como causa de las mastitis caprinas. Aunque diversas especies, tales como *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus uberis*, *Streptococcus dysgalactiae* y *Streptococcus zooepidermicus* han sido aislados en cabras (LERONDELLE y POUTREL, 1984; BAXENDELL, 1985; LEON y cols., 1985).

Esto contrasta con el ganado vacuno, donde la prevalencia de los *Streptococcus spp.* es mucho más importante (WILSON y RICHARDS, 1980); aunque también en porcentajes importantes han sido hallados en el ganado caprino en determinadas áreas geográficas (EL-SERGANY y cols., 1982; THORNTON, 1983; ISMAIL y cols., 1984; LERONDELLE y POUTREL, 1984; SHOUMAN y cols., 1986).

Otros microorganismos que se han aislado de mastitis subclínicas con prevalencias más bajas han sido *Bacillus spp.* (RAEVORY y KOIRANEN, 1979; DELAMPRE y cols., 1984; KALOGRIDOU-VASSILIADOU, 1991), coliformes (SMITH y ROGUINSKY, 1977; THORNTON, 1983; HUNTER, 1984; MANSER, 1985; EAST y cols., 1987; KALOGRIDOU-VASSILIADOU, 1991), *Micrococcus spp.* (KALOGRIDOU-VASSILIADOU, 1991), *Pseudomonas spp.* (LEPPER y MATTHEWS, 1966; EAST y cols., 1987; KALOGRIDOU-VASSILIADOU, 1991), *Pasteurella spp.* (BAGADI y RAZIG, 1976; MANSER, 1985; MANSER, 1986; EAST y cols., 1987), *Mycoplasma spp.* (BARILE y cols., 1979; THORNTON, 1983; LERONDELLE, 1984; EAST y cols., 1987; BLIKSLAGER y ANDERSON, 1992; CORRALES y cols., 1992), *Corynebacterium spp.* (BRAMLEY y

REVISION BIBLIOGRAFICA

DODD, 1984; KALOGRIDOU-VASSILIADOU, 1991; CORRALES y cols., 1992), hongos (BAXENDELL, 1985; CORRALES y cols., 1992).

Una forma especial de mastitis subclínica es la irritación de la ubre o alteración de la secreción (mastitis aséptica). Su causa no se halla en la infección por bacterias, sino en la influencia de factores ambientales tales como golpes o presiones o bien ordeños equivocados y duraderos, etc. También puede ser consecuencia de afecciones generales (MANSER, 1985; KLEINSCHROTH y cols., 1989).

2.3.- EPIDEMIOLOGÍA

2.3.1.- FACTORES DEPENDIENTES DEL HOSPEDADOR, AGENTE Y MEDIO AMBIENTE

La aparición de una mastitis depende de diversos y numerosos factores (animal, medio ambiente y germen causal). Por este motivo se la califica "enfermedad multifactorial" (SCHALM, 1977; O'BRIEN, 1982; CRIPPS, 1986; EL-YAS y NASHED, 1988; MAYER y BOURNE, 1988; HUTTON y cols., 1990).

2.3.1.1.- *Hospedador*

Los principales factores a considerar son:

* Susceptibilidad del animal, que guarda relación con:

. Fase de lactación. La fase temprana (primeros dos o tres meses) es la más susceptible (KALRA y cols., 1962; NEWBOULD, 1973; TALOS y cols., 1975; NEWBOULD, 1976; EAST y cols., 1987; GONZALEZ y cols., 1990). Además, los animales también son más susceptibles en periodos de *stress* como sucede en la fase de estro (FRANK y POUNDEN, 1961; PAAPE y cols., 1979) y en la época del parto (McDOWELL y McDANIEL, 1968; SCHULTZE y PAAPE, 1974; PAAPE y cols., 1979; MAISI, 1990;

KALOGRIDOU-VASSILIADOU y cols., 1991).

. Edad del animal. Los animales mayores (más de cuatro períodos de lactación) son más susceptibles (OLIVER y cols., 1956; KALRA y cols., 1962; MUNCH-PETERSON, 1968; SMITH y cols., 1985; OLIVER, 1988; CULLOR y cols., 1990).

. Nivel de resistencia hereditaria, posiblemente en relación con la forma del pezón y anatomía del conducto del pezón (SMITH Y ROGUINSKY, 1977; EAST y cols., 1987; OPDEBEECK, 1982).

. Lesiones de la piel del pezón, en especial del orificio (KALRA y cols., 1962; SMITH y ROGUINSKY, 1977; O'BRIEN, 1982; OPDEBEECK, 1982; THORNTON, 1983).

. Factores inmunitarios (PAAPE y cols., 1979; GUIDRY y cols., 1980; MAYER y BOURNE, 1988), incluyendo el nivel leucocitario de cada glándula mamaria y, entre otras cosas, que haya habido infección anterior, en especial por *Staphilococcus aureus* (FOX y MCDONALD, 1988; WATSON, 1992). Las infecciones por otras bacterias de baja patogenicidad, por ejemplo, *Staphilococcus epidermidis* (BRAMLEY, 1978; CULLOR y cols., 1990) aumentan la resistencia a los patógenos productores de mastitis, al provocar un aumento del contenido de polimorfonucleares en la leche.

2.3.1.2.- Medio ambiente

Dependen de lo siguiente:

* Grado de infección del medio, incluyendo mamas infectadas (DODD, 1983; CRIPPS, 1986; CULLOR y cols., 1990; KALOGRIDOU-VASSILIADOU y cols., 1991).

* Eficiencia del personal y aparatos de ordeño, incluyendo ordeño de alta velocidad y en especial, la higiene en la sala de ordeño (EDDY, 1977; PEARSON y MACKIE, 1979; DODD, 1983; CULLOR y cols., 1990; HUTTON y cols., 1990).

REVISION BIBLIOGRAFICA

El riesgo de la infección viene determinado por la relación del animal con las influencias del medio ambiente (CARROLL, 1977; KLEINSCHROTH y cols., 1989; CULLOR y cols., 1990; KALOGRIDOU-VASSILIADOU y cols., 1991).

2.3.1.3.- Agente

La frecuencia con la que aparecen cada uno de los tipos etiológicos de mastitis varía según la capacidad del microorganismo para establecer una infección en el tejido mamario (ANDERSON, 1983; CRIPPS, 1986). Las diferencias entre bacterias, en lo que se refiere a la capacidad de producir un estado mastítico, dependen de por lo menos dos grupos importantes: características bacterianas y mecanismos de transmisión.

Para las principales bacterias productoras de mastitis son las siguientes:

* La capacidad del microorganismo de sobrevivir en el medio cercano al animal; esto es, su resistencia a influencias ambientales, incluyendo procedimientos de limpieza y desinfección (EDDY, 1977; CRIPPS, 1986; CULLOR y cols., 1990; DODD, 1983; THORNTON, 1983; CULLOR y cols., 1990).

* Su capacidad para colonizar el conducto del pezón (BRAMLEY, 1979; ANDERSON, 1983; CULLOR y cols., 1990; KALOGRIDOU-VASSILIADOU y cols., 1991).

* Su capacidad para adherirse al epitelio mamario y establecer una reacción mastítica (SCHALM, 1977; ANDERSON, 1983; BROOKS y BARNUM, 1984; CULLOR y cols., 1990).

* Su resistencia al tratamiento con antibióticos (SCHALM, 1977; ZIV, 1978; O'BRIEN, 1982; THORNTON, 1983; DU PREEZ, 1989; CULLOR y cols., 1990).

Los *Staphylococcus aureus* son los microorganismos más prevalentes de los patógenos mayores de las mastitis (BUDDLE y COOPER, 1978;

WILSON y RICHARDS, 1980; MANSER, 1985). Los microabscesos intramamarios que resultan de la infección por *Staphylococcus aureus* (MELLY y cols., 1974; GUDDING y cols., 1984), y la resistencia que muestran al tratamiento con antibióticos (BUDDLE y COOPER, 1978; CRAVEN y ANDERSON, 1984; FOX y MCDONALD, 1988), explican en parte el porqué estos microorganismos patógenos pueden producir infecciones de tipo crónico (MUDD, 1970; ANDERSON, 1982; MAYER y BOURNE, 1988).

La resistencia de los *Staphylococcus aureus* a diversos componentes del sistema inmune pueden estar también relacionados a la capacidad de estos microorganismos a producir mastitis crónicas (PETERSON y cols., 1978; FOX y MCDONALD, 1988; NIEMIALTOWSKY y cols., 1988).

En cuanto a la patogenicidad de los estafilococos coagulasa-negativos, ha sido tema de controversia entre los distintos investigadores, pero al comprobarse que estas bacterias producen un incremento del contaje de células somáticas y una disminución de la producción de leche, se ha indicado que tales microorganismos deben de considerarse patógenos genuinos de la ubre caprina (ROGUINSKY y cols., 1971; HOLMBERG, 1973; SMITH y ROGUINSKY, 1977; KALOGRIDOU-VASSILIADOU, 1991).

2.3.2.- FUENTES DE INFECCION

Los orígenes importantes de los estafilococos coagulasa-negativos son la piel del pezón y la punta del mismo para especies tales como *Staphylococcus lentus* y *Staphylococcus haemolyticus* (THORNTON, 1983; DEVRIESE y DE KEYSER, 1980; POUTREL y cols., 1990), mientras que *Staphylococcus epidermidis* y *Staphylococcus simulans* se encuentran fundamentalmente en las muestras de leche (DEVRIESE y DE KEYSER, 1980; KALOGRIDOU-VASSILIADOU, 1991).

Las bacterias que viven normalmente en el medio, como *Escherichia coli* (PHILPOT, 1979), causan mastitis con mucha menor frecuencia pero, cuando lo hacen, la enfermedad es mucho más rebelde a medidas higiénicas de control (EDDY, 1977; DODD, 1983).

REVISION BIBLIOGRAFICA

Los gérmenes coliformes suelen ser los patógenos secundarios más importantes en muchos rebaños caprinos (KALOGRIDOU-VASSILIADOU, 1991). Se encuentran en el estiércol y en las camas de los animales, mientras que las mastitis por pseudomonas se pueden originar de aguas contaminadas, suelos pantanosos o de la limpieza inadecuada de las máquinas (PHILPOT, 1979; BAXENDELL, 1985; KALOGRIDOU-VASSILIADOU, 1991).

Una elevada incidencia de la presencia de *Bacillus spp.* se atribuye a prácticas poco higiénicas en las granjas. El alojamiento y manejo inadecuado de los animales los induce a una mayor exposición de los microorganismos medioambientales (BRAMLEY y DODD, 1984; KALOGRIDOU-VASSILIADOU, 1991; KALOGRIDOU-VASSILIADOU y cols., 1991).

En cuanto a *Corynebacterium spp.*, algunas especies son probablemente comensales de las ubres y otras pueden diseminarse a través de heridas, las tonsilas, membranas mucosas y el tracto genital (BRAMLEY y DODD, 1984; KALOGRIDOU-VASSILIADOU, 1991).

En relación a la transmisión de *Mycoplasma spp.* se produce fundamentalmente a través de exudados de animales infectados y de leche de cabras con infecciones intramamarias por dichas especies (BLIKSLAGER y ANDERSON, 1992). Los portadores sanos también pueden transmitir estos microorganismos (ADLER y BROOKS, 1982). La infección con *Mycoplasma spp.* puede permanecer latente durante meses, hasta que una situación estresante induce la presentación de la enfermedad (ADLER y BROOKS, 1982; BLIKSLAGER y ANDERSON, 1992).

La contaminación de las manos de los ordeñadores, paños de lavado y copas de aparatos de ordeño pueden diseminar con rapidez la infección a los pezones de otros animales por la leche procedente de glándulas infectadas (DEVRIESE, 1979; BRAMLEY y DODD, 1984).

2.3.3.- MECANISMOS DE CONTAGIO

La infección de cada glándula mamaria ocurre a través del conducto del pezón, a partir de dos fuentes principales de contaminación: la ubre infectada y el medio (SMITH y ROGUINSKY, 1977; CRIPPS, 1986;

REVISION BIBLIOGRAFICA

CULLOR y cols., 1990; SENFT y NEUDECKER, 1991; KALOGRIDOU-VASSILIADOU y cols., 1991).

En bovinos lecheros y cabras de ordeño, las infecciones importantes son aquellas que persisten con facilidad en la ubre, en especial *Staphylococcus aureus* y *Streptococcus agalactiae* (DAVIDSON, 1961; FORBES, 1968; CULLOR y cols., 1990; SCHALM, 1977; MAISI y RIIPINEN, 1991).

Los principales reservorios de los *Staphylococcus aureus* son la piel de la ubre y del pezón, y la leche de las glándulas infectadas (DAVIDSON, 1961; FORBES, 1968; KLEINSCHROTH y cols., 1989). Consecuentemente la infección se puede desarrollar mediante los utensilios del ordeño, los trapos y las manos del ordeñador (KLEINSCHROTH y cols., 1989; KALOGRIDOU-VASSILIADOU, 1991).

2.4.- PATOGENIA

Si predominan las agresiones ambientales sobre la capacidad defensiva del microorganismo, la glándula del animal mostrará una predisposición hacia la infección y aparecerá una mastitis (GUIDRY y cols., 1980; KLEINSCHROTH y cols., 1989; CULLOR y cols., 1990; HUTTON y cols., 1990; KALOGRIDOU-VASSILIADOU y cols., 1991).

La infección de la glándula mamaria se produce siguiendo la vía del canal del pezón (SMITH y ROGUINSKY, 1977; THORNTON, 1983; CULLOR y cols., 1990; KALOGRIDOU-VASSILIADOU y cols., 1991), y a simple vista el desarrollo de la inflamación después de la infección se considera un fenómeno natural. Sin embargo, el desarrollo de una mastitis es más compleja de lo que este concepto parece indicar, y quizá resulte más satisfactorio explicarla en términos de tres etapas: invasión, infección e inflamación.

2.4.1.- FASE DE INVASION

La invasión es la etapa en la que los microorganismos pasan del

REVISION BIBLIOGRAFICA

exterior de la ubre a la leche que se encuentra en el conducto del pezón; hallándose implicados los siguientes factores:

* La presencia de un patógeno determinado y la densidad de la población de bacterias existentes en el medio. El nivel de infección de la mama afectada y el grado de contaminación de la piel de los pezones, se utilizan con frecuencia como índice de este factor (EDDY, 1977; DODD, 1983; CRIPPS, 1986; KALOGRIDOU-VASSILIADOU y cols., 1991).

* La frecuencia con que los pezones, especialmente las puntas, se hallan contaminadas con estas bacterias, depende en gran medida de la eficacia de la higiene del ordeño (EDDY, 1977; ZARKOWER y SCHEUCHENBERGER, 1978; DODD, 1983; HUTTON y cols., 1990; KALOGRIDOU-VASSILIADOU y cols., 1991).

* El grado de lesión de los esfínteres de los pezones, que facilita la entrada de bacterias en el conducto glandular (CRIPPS, 1986). Contribuyen en forma importante al desarrollo de este factor el diseño de la máquina de ordeño, la adaptación, la conservación y el uso apropiado de la misma, el cuidado de los pezones y el posible reflujó de leche hacia la ubre desde la copa de ordeño durante el mismo (DODD, 1983; CULLOR y cols., 1990; KALOGRIDOU-VASSILIADOU y cols., 1991).

* El tono del esfínter de los pezones, especialmente en el período inmediatamente posterior al ordeño, cuando dicho esfínter se halla más relajado. La debilidad del esfínter facilita la invasión, permitiendo la aspiración y crecimiento bacteriano en el pezón (EDDY, 1977; CULLOR y cols., 1990; SENFT y NEUDECKER, 1991).

* Y la presencia de sustancias antibacterianas en el conducto glandular (HOGAN y cols., 1987; HOGAN y SMITH, 1987; CULLOR y cols., 1990; SENFT y NEUDECKER, 1991).

2.4.2.- FASE DE DIFUSION

En esta etapa las bacterias se multiplican rápidamente e invaden el tejido mamario (KLEINSCHROTH y cols., 1989; CULLOR y cols., 1990).

REVISION BIBLIOGRAFICA

Después de la invasión puede establecerse una población bacteriana en el conducto del pezón y, utilizando esa residencia como base, multiplicarse y diseminarse en el tejido mamario, dependiendo de la susceptibilidad del animal (ANDERSON, 1983; KLEINSCHROTH y cols., 1989; CULLOR y cols., 1990; HUTTON y cols., 1990; KALOGRIDOU-VASSILIADOU y cols., 1991).

Los factores que afectan a esta fase de difusión comprende los siguientes elementos:

* El tipo de bacteria, que determina su capacidad de multiplicarse en la leche y adherirse al epitelio mamario (SCHALM, 1977; CRIPPS, 1986; FOX y MCDONALD, 1988; MAYER y BOURNE, 1988). La virulencia de cada especie bacteriana al parecer se debe, por lo menos en parte, a esta capacidad de adherencia (WANASINGHE, 1981; ANDERSON, 1983; CRAVEN y ANDERSON, 1984).

* La susceptibilidad de las bacterias a los antibióticos que se emplean normalmente. Esto puede depender de la resistencia natural o adquirida resultante de la utilización inadecuada de los antibióticos (SCHALM, 1977; CRAVEN y ANDERSON, 1984; BAXENDELL, 1985; CRIPPS, 1986; FOX y MACDONALD, 1988; BUSWELL y cols., 1989).

* La presencia de sustancias protectoras en la leche. Las sustancias defensivas pueden ser naturales o hallarse en la leche como consecuencia de infección previa o de vacunación (SCHALM, 1977; GUIDRY y cols., 1980; ANDERSON, 1983; MAYER y BOURNE, 1988; WATSON, 1992).

* De la etapa de lactación; donde la infección se produce más fácilmente en el período de secado, debido a la ausencia de flujo físico (OLIVER, 1988; KLEINSCHROTH y cols., 1989). Las glándulas mamarias son marcadamente susceptibles a nuevas infecciones intramamarias durante este periodo, especialmente las primeras dos semanas después del secado y también durante el periodo anterior y posterior al parto (OLIVER y DODD, 1956; MUNCH-PETERSON, 1968; SMITH y cols., 1985).

2.4.3.- FASE DE INFLAMACION

REVISION BIBLIOGRAFICA

La enfermedad puede aparecer como mastitis subclínica, es decir, sin síntomas apreciables, o bien como mastitis clínica, con signos evidentes de la enfermedad (tumefacción o endurecimiento mamario correspondiente, alteraciones de la leche, etc.) (THORNTON, 1983; KLEINSCHROTH y cols., 1989; CULLOR y cols., 1990).

Se dice que la mastitis es subclínica cuando hay evidencia de inflamación; por ejemplo, recuento elevado de células somáticas en la leche sin anomalía visible de la leche o ubre (BAXENDELL, 1985; EAST y cols., 1987; CULLOR y cols., 1990).

Los factores que influyen en esta fase de inflamación son:

* La patogenicidad y capacidad invasora de los tejidos por parte de las bacterias causales (ANDERSON, 1983); las cuales varían mucho entre las bacterias. Por ejemplo, los estreptococos causan pocos cambios patológicos en las células secretoras, en tanto que los estafilococos producen cambios degenerativos visibles macroscópicamente (SMITH, 1977; FOX y MACDONALD, 1988; MAYER y BOURNE, 1988; KLEINSCHROTH y cols., 1989).

* La susceptibilidad de los tejidos mamarios a las bacterias. Esta puede variar desde gran resistencia, por la presencia de un anticuerpo tisular, hasta hipersensibilidad como resultado de infección previa (SCHALM, 1977; GUIDRY y cols., 1980).

De estas tres fases, la prevención de la fase de invasión brinda las mejores perspectivas para disminuir la incidencia de la mastitis por un manejo adecuado, sobre todo mediante el uso de métodos higiénicos convenientes (EDDY, 1977; ANDERSON, 1983; DODD, 1983; THORNTON, 1983; CRIPPS, 1986; CULLOR y cols., 1990; HUTTON y cols., 1990).

2.5.- LUCHA

2.5.1.- CONTROL

REVISION BIBLIOGRAFICA

Los programas actuales del control de la mastitis, tienen por objeto reducir la prevalencia a un nivel posible, económicamente rentable (HOWARD y cols., 1987; KLEINSCHROTH y cols., 1989; CULLOR y cols., 1990; MILLER y BARLETT, 1991; BLOOD y RADOSTITS, 1992).

La política moderna hacia el control de la mastitis sigue un método con dos fases:

* Un Plan de Alerta frente a la mastitis (FRANCIS, 1984; BAXENDELL, 1985; CULLOR y cols., 1990; BLOOD y RADOSTITS, 1992), dirigido a advertir a los granjeros productores de leche, en general, sobre las pérdidas causadas por la mastitis e identificar aquellos rebaños en que existe un problema. Esto casi siempre se hace realizando recuentos celulares somáticos en tanques de leche del rebaño (DODD, 1983; BAXENDELL, 1985; EAST y cols., 1987; KLEINSCHROTH y cols., 1989; CULLOR y cols., 1990; MAISI, 1990; KALOGRIDOU-VASSILIADOU y cols., 1992).

* Una vez alertados los granjeros con problemas de mastitis en su rebaño, es necesario contar con un programa de control de la mastitis que sea eficaz, para limitar la aparición de la enfermedad (O'BRIEN, 1982; DODD, 1983; BAXENDELL, 1985; KLEINSCHROTH y cols., 1989; CULLOR y cols., 1990; BLOOD y RADOSTITS, 1992).

Aunque se ha identificado la mastitis como causa de pérdidas masivas en la producción de leche y a pesar de la existencia de estos programas de control eficaces, los granjeros son poco conscientes de la importancia de la mastitis, en especial de la mastitis subclínica (MEIN y cols., 1977; BUSHNELL, 1980; BAXENDELL, 1985; KLEINSCHROTH y cols., 1989; BLOOD y RADOSTITS, 1992).

El porcentaje de granjeros que adoptan procedimientos de higiene básicos, como inmersión del pezón y tratamiento en el periodo de secado, es apenas el 25 por 100 aproximadamente (BAXENDELL, 1985; KLEINSCHROTH y cols., 1989; CULLOR y cols., 1990; BLOOD y RADOSTITS, 1992).

En parte, como medio para vencer esta renuencia, el control de la mastitis se ha incorporado en programas planificados de salud y producción que fomentan el control de la reproducción, la mastitis y otras enfermedades,

REVISION BIBLIOGRAFICA

y la conservación de la producción de leche a niveles financieros óptimos (KLEINSCHROTH y cols., 1989; CULLOR y cols., 1990; BLOOD y RADOSTITS, 1992).

Para ser eficaz, todo programa de control de la mastitis debe:

* Proporcionar una ventaja económica (KLEINSCHROTH y cols., 1989; HOWARD y cols., 1987; CULLOR y cols., 1990; MILLER y BARLETT, 1991; BLOOD y RADOSTITS, 1992).

* Ser accesible a la comprensión y habilidad técnica del granjero (KLEINSCHROTH y cols., 1989; CULLOR y cols., 1990; BLOOD y RADOSTITS, 1992).

* Permitir su inclusión en las medidas de terapia general empleadas (KLEINSCHROTH y cols., 1989; HOWARD y cols., 1987; CULLOR y cols., 1990; MILLER y BARLETT, 1991; BLOOD y RADOSTITS, 1992).

* Alentar a los granjeros, reduciendo rápidamente la aparición de mastitis clínica (KLEINSCHROTH y cols., 1989; CULLOR y cols., 1990; BLOOD y RADOSTITS, 1992).

La mayor parte de los programas de control en el pasado, no satisfacían estos criterios y en casi todas las granjas lecheras y zonas desarrolladas, incluso hoy, el control de la mastitis depende del tratamiento de los casos clínicos y del uso de técnicas higiénicas relativamente ineficaces en los locales de ordeño (DODD, 1983; BAXENDELL, 1985; EAST y cols., 1987; CULLOR y cols., 1990; BLOOD y RADOSTITS, 1992).

Como resultado existen buen número de casos subclínicos, y hay propagación ininterrumpida a otras mamas. En casi todas las poblaciones lecheras el porcentaje de mamas afectadas es del orden del 25 a 50 p. 100, y son por ello muy elevadas las pérdidas financieras (DODD, 1983; BAXENDELL, 1985; CRIPPS, 1986; EAST y cols., 1987; BUSWELL y cols., 1989; KLEINSCHROTH y cols., 1989; CULLOR y cols., 1990; BLOOD y RADOSTITS, 1992).

Se requiere, por tanto, un programa de control que satisfaga los criterios antes citados y que pueda aplicarse a diversos niveles de

REVISION BIBLIOGRAFICA

rentabilidad, con objeto de limitar el índice de infección de las mamas a un nivel predeterminado (KLEINSCHROTH y cols., 1989; HOWARD y cols., 1987; CULLOR y cols., 1990; MILLER y BARLETT, 1991; BLOOD y RADOSTITS, 1992).

Los dos criterios necesarios para limitar la infección de las mamas son:

- A) Reducción del proceso infeccioso en las mamas infectadas
- B) Disminución del índice de nuevas infecciones

2.5.1.1.- Tratamiento

2.5.1.1.1.- Normas generales

En el tratamiento de las inflamaciones de la ubre se utilizan en la actualidad antibióticos y sulfamidas. Durante la lactancia hay que emplear medicamentos de gran actividad y rapidez de acción, a dosis elevadas (medicamentos de corta duración), que se eliminan en corto tiempo (WILSON, 1980; MANSER, 1985; BUSWELL y cols., 1989; KLEINSCHROTH y cols., 1989).

El resultado terapéutico depende en gran medida de la eficacia, la dosificación y el tiempo de empleo del medicamento elegido (BAGGOT, 1977; ZIV, 1980a; ANDERSON, 1982; MOORE y HEIDER, 1984; BUSWELL y cols., 1989; DU PREEZ, 1989).

En los casos clínicos, con signos evidentes de inflamación, el tratamiento ha de ser urgente. Así como en las mastitis por estreptococos, por su fácil contagio, y en las infecciones subclínicas, cuando la leche obtenida presenta un elevado contenido celular (WILSON, 1980; DU PREEZ, 1985; KLEINSCHROTH y cols., 1989; ANDERSON y cols., 1991).

El tratamiento durante el periodo de secado se halla indicado en las formas subclínicas como medida de prevención, en los rebaños con

REVISION BIBLIOGRAFICA

alteraciones sanitarias generales. Los mejores resultados terapéuticos se obtienen con la determinación del agente causal y del antibiótico para el que muestra mayor sensibilidad (WILSON, 1980; KLEINSCHROTH y cols., 1989; BLOOD y RADOSTITS, 1992).

Durante la lactación el tratamiento de estas mastitis subclínicas se debe realizar sólo en casos excepcionales, por ejemplo, en la eliminación de un foco de infección o en animales jóvenes y valiosos (KLEINSCHROTH y cols., 1989).

Los problemas de las mastitis en una ganadería no suelen ser resueltos por el simple tratamiento de los animales enfermos, a pesar de que con ello se mejore considerablemente el estado sanitario (ZIV, 1980a; O'BRIEN 1982; DODD, 1983; THORNTON, 1983; MANSER, 1985; CRIPPS, 1986; DU PREEZ, 1989; CULLOR y cols., 1990).

Para que el tratamiento antibacteriano de las mastitis sea exitoso la droga activa debe de alcanzar el foco de infección en una concentración que exceda la concentración mínima inhibitoria (WILSON, 1980; ZIV, 1980a; MOORE y HEIDER, 1984; BUSWELL y cols., 1989; DU PREEZ, 1989), y además estos niveles deben mantenerse durante el tiempo apropiado necesario para romper el ciclo de producción de la toxina y la replicación del patógeno causal (BAGGOT, 1977; WILSON, 1980; MOORE y HEIDER, 1984; MANSER, 1985; BUSWELL y cols., 1989; DU PREEZ, 1989).

Que el tratamiento vía sistémica de las mastitis sea exitoso depende del paso efectivo de la droga desde la sangre hacia la leche y que éste llegue al foco de infección (ZIV, 1980a; O'BRIEN, 1982; BUSWELL y cols., 1989; DU PREEZ, 1989).

El tratamiento intramamario se ha aceptado como la ruta de elección en el tratamiento de las mastitis subclínicas, crónicas o subagudas (FUNKE, 1961; PLOMMET y LE LOUDEC, 1975; WILSON, 1980; BUSWELL y cols., 1989; DU PREEZ, 1989).

Para el tratamiento antibiótico de las mastitis se debe decidir que éste se haga vía intramamaria, sistémica, o bien una combinación de ambas vías, la sistémica e intramamaria (ROBINSON, 1980; WILSON, 1980; ZIV, 1980a; MOORE y HEIDER, 1984; DU PREEZ, 1989).

REVISION BIBLIOGRAFICA

La administración de drogas por infusión intramamaria es con mucho el método más común para el tratamiento de las mastitis (ZIV, 1980a; MOORE y HEIDER, 1984; NICKERSON y BODDIE, 1985; OLIVER, 1988; BUSWELL y cols., 1989; ANDERSON y cols., 1991).

La capacidad para que una droga pase de la circulación sanguínea hacia la leche depende en gran parte de tres propiedades de su molécula: solubilidad lipídica, grado de ionización (dependiente de la constante de disociación (pK)) y la capacidad de unión a las proteínas del plasma (SJOQUIST y cols., 1976; WILSON, 1980; O'BRIEN 1982; DU PREEZ, 1989). El paso de las drogas a través de la barrera de la sangre hacia la leche tiene lugar por difusión pasiva (MILLER y cols., 1967; MOORE y HEIDER, 1984; O'BRIEN, 1984; DU PREEZ, 1989).

Lo ideal para el tratamiento de las infecciones intramamarias o mastitis es la elección de una droga antimicrobiana sensible a los microorganismos patógenos (WILSON, 1980; ANDERSON, 1982; MOORE y HEIDER, 1984; BUSWELL y cols., 1989; DU PREEZ, 1989; BLOOD y RADOSTITS, 1992).

Debido al tiempo que lleva las determinaciones de la sensibilidad, por razones prácticas, inicialmente se administran antibióticos de amplio espectro. En general, los antibióticos de espectro reducido son bactericidas y aquellos que tienen un amplio espectro son bacteriostáticos (WILSON, 1980; DU PREEZ, 1989; KLEINSCHROTH y cols., 1989).

Si no se realiza la determinación de antibiogramas, se deben elegir antibióticos de amplio espectro efectivos contra bacterias Gram-positivas y Gram-negativas basados en el conocimiento de las propiedades farmacocinéticas de las drogas (DU PREEZ, 1985; MACDIARMID, 1980; MOORE y HEIDER, 1984; ZIV, 1980b; ZIV, 1980c; ZIV, 1980d).

El tratamiento durante el periodo de secado se halla indicado en las formas subclínicas como medida de prevención, en los rebaños con importantes alteraciones sanitarias generales (NATZKE y cols., 1972; MANSER, 1985; NATIONAL MASTITIS COUNCIL, 1987; KLEINSCHROTH y cols., 1989; BLOOD y RADOSTITS, 1992).

Los objetivos de la lucha sistemática contra la mastitis son los

REVISION BIBLIOGRAFICA

siguientes: (1) mantenimiento de la capacidad natural de resistencia de la glándula mamaria, (2) prevención de contagios y (3) acortamiento de la enfermedad mediante tratamiento adecuado (SMITH y ROGUINSKY, 1977; ANDERSON, 1982; DODD, 1983; BAXENDELL, 1985; CRIPPS, 1986; DU PREEZ, 1989; CULLOR y cols., 1990; BLOOD y RADOSTTIS, 1992).

2.5.1.1.2.- Fallos terapéuticos

Entre las razones por las cuales se producen fallos en los tratamientos de las mastitis se encuentran los siguientes:

1) Factores relacionados con el agente causal

Algunas bacterias invasoras de los tejidos tales como los estafilococos se encapsulan en el parénquima de la ubre rodeados por un tejido grueso y fibroso que evita que el antibiótico alcance el foco de infección (MACDIARMID, 1980; ANDERSON, 1982; CRAVEN y ANDERSON, 1984; DU PREEZ, 1989).

Las infecciones en la ubre por *Staphylococcus aureus* promueven el desarrollo de un tejido cicatricial localizado al cual no tienen acceso los vasos sanguíneos, es por ello que las inyecciones intramusculares e intravenosas producen escasos beneficios. (CRAVEN y ANDERSON, 1982; PANKEY, 1986; DU PREEZ, 1989).

El tratamiento puede eliminar a las bacterias que no se encuentran encapsuladas, pero posteriormente las bacterias que se encuentran en el interior del tejido encapsulado pueden liberarse, multiplicarse y causar un daño adicional al tejido secretor de la ubre y promueven más formación de tejidos encapsulados (CRAVEN y ANDERSON, 1982; PANKEY, 1986; DU PREEZ, 1989).

Además, *Staphylococcus aureus* y otros patógenos de las mastitis pueden sobrevivir en determinadas circunstancias dentro de los leucocitos. Es por ello, que cuando se administran tratamientos con antibióticos, tales

REVISION BIBLIOGRAFICA

patógenos pueden no entrar en contacto con la droga y por lo tanto no ser eliminados (CRAVEN y ANDERSON, 1982; PANKEY, 1986; DU PREEZ, 1989).

Algunos microorganismos tales como los *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*, se defienden produciendo enzimas capaces de digerir sustancias antibacterianas (MOORE y HEIDER, 1984).

Por estas causas los fallos terapéuticos pueden ocurrir incluso cuando los microorganismos sean sensibles a los antibióticos utilizados (PLATONOW y BLOBEL, 1963; CRAVEN y ANDERSON, 1984; MOORE y HEIDER, 1984; DU PREEZ, 1989).

Otra de las razones a las que se debe el fallo terapéutico es que muchos antibióticos tales como las penicilinas y las cefalosporinas impiden la síntesis de nuevas paredes celulares a medida que se van formando nuevas células bacterianas (YOUMANS y cols., 1975; PANKEY, 1986; DU PREEZ, 1989).

En algunas ocasiones ciertas bacterias desarrollan una forma "L". Estas formas bacterianas sobreviven sin pared celular y se encuentran rodeadas sólo por su membrana celular, es por ello que estas formas no son susceptibles a los antibióticos que atacan la pared celular (DU PREEZ, 1989). La forma "L" puede cambiar y revertir a su forma bacteriana normal (YOUMANS y cols., 1975; PANKEY, 1986).

En otras ocasiones el fallo de los tratamientos son debidos a la introducción de un segundo patógeno (por ejemplo: hongos, etc.) cuando se utilizan cánulas contaminadas en el interior del canal del pezón (ULBERG, 1954; ERSKINE y cols., 1987; DU PREEZ, 1989) o bien cuando se aplica la infusión de drogas intramamarias donde la punta del pezón no ha sido previamente limpiada y desinfectada (NICKERSON y BODDIE, 1985; DU PREEZ, 1989).

2) Factores relacionados con las lesiones de la ubre

También en todos los casos de mastitis, el edema y los productos de

REVISION BIBLIOGRAFICA

la inflamación producen una cierta obstrucción en la difusión de los antibióticos debido a la compresión o el bloqueo del sistema de conducción de la leche (ULBERG y cols., 1958; MACDIARMID, 1980; ZIV, 1980d; MOORE y HEIDER, 1984; CULLOR y cols., 1990).

Es por ello, que se recomienda una frecuente extracción de la leche con intervalos de una a dos horas para así eliminar las toxinas, detritus, bacterias y otros productos inflamatorios y mantener con potencia el sistema de conducción de la leche (ANON, 1977; DU PREEZ, 1981; DU PREEZ, 1989; KLEINSCHROTH y cols., 1989).

En otras circunstancias como en las mastitis producidas por estreptococos, y en algunas mastitis por estafilococos, el tratamiento produce curación clínica pero no la absoluta eliminación de la bacteria causal (PLATONOW y BLOBEL, 1963; SANDERSON, 1966; MOORE y HEIDER, 1984; DU PREEZ, 1989).

Los tratamientos inadecuados tales como su aplicación durante periodos demasiado cortos, resultan sólo con curación clínica pero no con la eliminación del agente causal (PLATONOW y BLOBEL, 1963; SANDERSON, 1966; MOORE y HEIDER, 1984; DU PREEZ, 1989).

El tratamiento sistemático como un complemento al tratamiento intramamario ha sido recomendado como un medio de solucionar estos problemas (SWARBRICK, 1966; WILSON, 1980; MOORE y HEIDER, 1984; MANSER, 1985; DU PREEZ, 1989).

Las mastitis que producen necrosis tisular de la ubre determinan un pobre suplemento de sangre a las áreas afectadas (GIESECKE, 1977; DU PREEZ, 1989) y consecuentemente hay una disminución del potencial redox que favorece las bacterias mastitogénicas anaerobias (FINEGOLD y cols., 1971; DU PREEZ, 1989), y por lo tanto no hay un paso efectivo de las drogas hacia el tejido necrótico avascular de la ubre.

3) Factores relacionados con la farmacocinética de la droga empleada

Las propiedades fármaco-cinéticas de las drogas empleadas para las

REVISION BIBLIOGRAFICA

mastitis también son factores importantes que influyen en el éxito del tratamiento (ZIV, 1980d; ANDERSON, 1982; MOORE y HEIDER, 1984; DU PREEZ, 1989; ANDERSON y cols., 1991).

La oxitetraciclina y el cloranfenicol inyectables poseen limitadas propiedades de biodisponibilidad intramuscular, y deberían de administrarse vía intravenosa (ZIV, 1980d; DU PREEZ, 1989).

El grado de transferencia de las drogas desde la sangre hacia la leche es directamente proporcional al gradiente de concentración a través de la membrana e inversamente proporcional a la capacidad de ionización de la droga, ya que las moléculas ionizadas pasan a través de las membranas biológicas con dificultad (MACDIARMID, 1978; MACDIARMID, 1980; MOORE y HEIDER, 1984; DU PREEZ, 1989).

Los antibióticos que alcanzan la mayor efectividad de traspaso desde la sangre hacia la leche son los macrólidos (eritromicina, lincomicina, espiromocina y tilosina), pero el espectro antibacteriano de estas drogas son limitados (ZIV, 1980d; MOORE y HEIDER, 1984; DU PREEZ, 1989).

Otros fallos terapéuticos son debidos a la elección de un agente antimicrobiano equivocado e inefectivo (ZIV, 1980d; THORNTON, 1983; MOORE y HEIDER, 1984; DU PREEZ, 1989), como por ejemplo la aplicación de penicilina para el tratamiento de *Staphylococcus aureus* productores de beta-lactamasa. Esta enzima destruye la penicilina, por lo que el tratamiento con este antibiótico lo más probable es que sea inefectivo (ANDERSON, 1982).

Algunas cepas mastitogénicas de *Bacteroides fragilis* son resistentes a la ampicilina, cefalotina y amoxicilina (DU PREEZ, 1986; DU PREEZ, 1989). Algunas de estas cepas producen cefalosporinasa lo cual hace resistente a estas bacterias a la cefalosporina (FINEGOLD y cols., 1971; DU PREEZ, 1989).

La resistencia bioquímica de las bacterias a los agentes antimicrobianos puede tener lugar a través de procesos de mutación, selección natural, transformación, transducción o conjugación de los microorganismos (YOUMANS y cols., 1975; DU PREEZ, 1989). Aunque la bacteria fuera inicialmente sensible al agente antimicrobiano, se pueden

REVISION BIBLIOGRAFICA

convertir en resistente y en tales casos se debe emplear otro agente antimicrobiano (MOORE y HEIDER, 1984).

Los aminoglicósidos son todos antibióticos básicos y su escasa solubilidad lipídica los hace inapropiados para el tratamiento sistemático de las mastitis. Con una solubilidad lipídica insuficiente la droga no se difunde correctamente a través de las membranas celulares (MACDIARMID, 1980; ZIV, 1980d; MOORE y HEIDER, 1984; DU PREZZ, 1989).

La concentración mínima inhibitoria de la droga, y las propiedades fisicoquímicas de los antibióticos son los mayores determinantes de la duración de las concentraciones efectivas de la droga en la ubre (MACDIARMID, 1978; ZIV, 1980d; MOORE y HEIDER, 1984; DU PREEZ, 1989).

Otro de los factores que afectan el éxito terapéutico es el grado de unión de los antibióticos a las proteínas séricas (ZIV y SULMAN, 1972; MOL, 1975) y la vida media de las drogas (DAVITYANANDA y RASMUSSEN, 1974).

Tanto la oxitetraciclina y el cloranfenicol son inactivados parcialmente en la leche por la quelación con los iones de calcio y de magnesio y por la combinación con la caseína (ZIV y SULMAN, 1972; MOL, 1975; DU PREEZ, 1989).

La corta vida media de trimethoprim en el plasma (50-100 minutos) limita la utilidad de esta droga. El trimethoprim en solución se elimina demasiado rápido como para que este producto sea útil para las mastitis (DAVITYANANDA y RASMUSSEN, 1974).

La patología del tejido de la ubre producido por la mastitis y consecuentemente el efecto que ocasiona en las propiedades farmacocinéticas de las drogas mastíticas, más que la amplia resistencia de los antibióticos, parecen ser las principales razones de los fallos terapéuticos (MOORE y HEIDER, 1984; DU PREEZ, 1989).

4) Otros factores

REVISION BIBLIOGRAFICA

Otros factores correspondientes a las medidas de manejo y prácticas veterinarias pueden producir fallos terapéuticos, como los correspondientes a tratamientos inadecuados (ZIV, 1980d; DU PREEZ, 1989; ANDERSON y cols., 1991), retraso en el tratamiento inicial (ZIV, 1980d; DU PREEZ, 1989), diagnósticos erróneos (ZIV, 1980d; DU PREEZ, 1989), traumas consecuentes a la inserción de la cánula o contaminación a la inserción de ésta (NICKERSON y BODDIE, 1985; BODDIE y NICKERSON, 1986).

A pesar del amplio uso de diversos antibióticos y de otros agentes quimioterápicos, los tratamientos antibacterianos de las mastitis son generalmente menos efectivos de lo deseable (ZIV, 1980d; DU PREEZ, 1989; KLEINSCHROTH y cols., 1989).

La respuesta al problema de las mastitis se halla en la prevención de nuevas infecciones intramamarias y del canal del pezón las cuales pueden producir mastitis, más que el tratamiento de las infecciones existentes (MANSER, 1985; DU PREEZ, 1989; KLEINSCHROTH y cols., 1989; BLOOD y RADOSTTITS, 1992).

El éxito del tratamiento de las mastitis durante el periodo de lactación de los animales es menor que durante el periodo de secado, especialmente para las mastitis estafilocócicas (MOORE y HEIDER, 1984; DU PREEZ, 1989; KLEINSCHROTH y cols., 1989).

Cuando se inicia un tratamiento, particularmente en rebaños-problema (es decir, aquellos con un incremento de los casos clínicos o subclínicos), se debe realizar asociado con medidas para descubrir y corregir los factores predisponentes (MOORE y HEIDER, 1984; DU PREEZ, 1989; KLEINSCHROTH y cols., 1989; BLOOD y RADOSTTITS, 1992).

Una completa revisión de las prácticas de manejo para el control de las mastitis está indicado en intervalos periódicos y más frecuentemente cuando los problemas aumentan (MOORE y HEIDER, 1984; DU PREEZ, 1989; KLEINSCHROTH y cols., 1989).

2.5.1.2.- Inmunización

REVISION BIBLIOGRAFICA

En ausencia de un estímulo antigénico, la respuesta inmune local de la glándula mamaria de los rumiantes se considera generalmente que es bastante escasa durante la lactación (WATSON, 1980; ANDERSON, 1982; OPDEBEECK, 1982; MATHISON y cols., 1984; CULLOR y cols., 1990).

Debido a que la mastitis es la enfermedad de mayor prevalencia y de mayor costo del ganado lechero, han sido muchos los esfuerzos dirigidos al desarrollo de vacunas para prevenirlas (ANDERSON, 1978; ANDERSON, 1982; OPDEBEECK, 1982; WATSON, 1984; COLDITZ y WATSON, 1985; PANKEY y cols., 1985; WATSON, 1988; WATSON y SCHWARTZKOFF, 1990; KALOGRIDOU-VASSILIADOU y cols., 1991; WATSON, 1992).

La inmunización con una variedad de preparaciones antigénicas administradas por diversas vías en la vaca, cabra y oveja han provisto de cierto grado de protección contra exposiciones antigénicas naturales y artificiales (ADLAM y cols., 1977; NORCROSS, 1977; WATSON, 1976; GUIDRY y cols., 1980; ANDERSON, 1982; OPDEBEECK, 1982; MATHISON y cols., 1984; KERLIN y WATSON, 1988; CULLOR y cols., 1990; WATSON, 1992).

En estos últimos años diversos investigadores han mejorado el conocimiento de la patogénesis (NICKERSON y PANKEY, 1985; WATSON, 1987a) e inmunidad (COLDITZ y WATSON, 1985; WATSON, 1992) en los procesos de mastitis. Como resultado de tales estudios se han conseguido mayores propiedades defensivas de las células fagocíticas de la ubre para inducir la protección (PAAPE y cols., 1981; WATSON, 1987b; EATSON, 1988; CULLOR y cols., 1990; WATSON y SCHWARTZKOFF, 1990; WATSON, 1992).

Es por ello, que se requiere una mayor información de los mecanismos inmunes que tienen lugar en la glándula mamaria, así como mayores evidencias que expliquen los posibles factores que contribuyen a una inadecuada vacunación (ANDERSON, 1982; OPDEBEECK, 1982; CRIPPS, 1986; KERLIN y WATSON, 1988; WATSON, 1992).

El estado de lactación y la edad son factores importantes en la susceptibilidad del animal frente a las mastitis, y la respuesta a la vacunación. El tiempo de administración de las vacunas con relación a estos factores deben ser pues considerados (OPDEBEECK, 1982).

Además, el éxito de un procedimiento de vacunación se basa no sólo en el conocimiento adecuado de la respuesta inmune del órgano a proteger, sino también en la utilización de la combinación correcta de los componentes de la vacuna (OPDEBEECK, 1982; KERLIN y WATSON, 1988; OLIVER, 1988; WATSON, 1992).

En relación a la profilaxis de las mastitis son necesarias más evaluaciones sobre las diferentes naturalezas antigénicas y patogénicas de los microorganismos causales, la inclusión de antígenos relevantes y la inclusión de adyuvantes más eficientes (ANDERSON, 1982; OPDEBEECK, 1982; CRIPPS, 1986; KERLIN y WATSON, 1988).

En estos últimos años otras de las medidas profilácticas llevadas a cabo para la lucha contra la mastitis son la aplicación de inmunomoduladores, los cuales pueden tener diversas aplicaciones en medicina veterinaria aunque son necesarias más investigaciones (MULCAHY y QUINN, 1986; FOX y cols., 1990; BENDA, 1993).

Uno de estos agentes inmunomoduladores es el gamma-interferón, el cual ha sido utilizado para evaluar su acción sobre la función de los fagocitos mamarios, observándose que los fagocitos expuestos a este agente responden con un realzamiento de la fagocitosis (STEINBERG y cols., 1987; FOX y cols., 1990) y de las funciones bactericidas (FLESCH y KAUFMAN, 1987; FOX y cols., 1990).

2.5.1.3.- Diagnóstico precoz de la infección mamaria

La decisión de emprender un programa para detectar las ubres infectadas de forma subclínica se ha convertido en una medida muy importante en el control de la mastitis (DODD, 1983; BAXENDELL, 1985; MANSER, 1985; CRIPPS, 1986; KLEINSCHROTH y cols., 1989; CULLOR y cols., 1990; KALOGRIDOU-VASSILIADOU y cols., 1992).

Se usan dos estrategias. Ambas incluyen el uso de una prueba de detección preliminar por medio de instalaciones y pruebas de laboratorio sencillas y un trabajo muy reducido (KLEINSCHROTH y cols., 1989; CULLOR y cols., 1990; BLOOD y RADOSTITS, 1992).

REVISION BIBLIOGRAFICA

La primera estrategia consiste en usar muestras de leche obtenidas para el estudio del rebaño (grasa y productividad). Estas muestras son adecuadas para someterlas al recuento celular individual de leche de cada animal, que puede realizarse en un contador celular automático (KLEINSCHROTH y cols., 1989; CULLOR y cols., 1990; BLOOD y RADOSTITS, 1992).

Las mamas positivas pueden clasificarse como afectadas y no realizar investigaciones adicionales, lo que se presta a la crítica de que el diagnóstico sería "número excesivo de células en leche" más que mastitis (CRIPPS, 1986; BLOOD y RADOSTITS, 1992).

La decisión de intentar o no la identificación microbiológica del patógeno puede tomarse en base a lo siguiente: si el propietario de un rebaño tiene problemas y pide ayuda, se debe realizar un examen completo de laboratorio, por lo menos de una muestra representativa del rebaño (BLOOD y RADOSTITS, 1992).

Sin embargo, cuando se pretende alentar el uso generalizado de un programa de control, es una práctica razonable el omitir todo examen en primera instancia (CULLOR y cols., 1990; BLOOD y RADOSTITS, 1992). Al final del primer año del programa será obvio, con base al recuento celular de tanques de leche y la prevalencia de casos clínicos, qué granjeros operan con éxito y cuáles no (CULLORS y cols., 1990; BLOOD y RADOSTITS, 1992).

La segunda estrategia puede entonces aplicarse a estos rebaños problema. Produce resultados satisfactorios a un costo razonable e incluye las siguientes medidas en ganado bovino y/o caprino:

* Detección de todas las muestras de las mamas usando la prueba de California para mastitis (SMITH y ROGUINSKY, 1977; POUTREL y LERONDELLE, 1983; MANSER, 1985; CRIPPS, 1986; MAISI y RIIPINEN, 1991; BLOOD y RADOSTITS, 1992).

* Identificación de las mamas infectadas por exámen microbiológico de las mamas que produzcan un resultado de la prueba de California de uno o más (KLEINSCHROTH y cols., 1989; CULLOR y cols., 1990; BLOOD y RADOSTITS, 1992).

REVISION BIBLIOGRAFICA

* Identificación de las bacterias, en general por cultivo simple (SMITH y ROGUINSKY, 1977; MANSER, 1985; CRIPPS, 1986; MAISI y RIIPINEN, 1991; BLOOD y RADOSTITS, 1992).

* Determinar la sensibilidad antibiótica de los patógenos (SMITH y ROGUINSKY, 1977; WILSON, 1980; MANSER, 1985; CRIPPS, 1986; DU PREEZ, 1989; MAISI y RIIPINEN, 1991; BLOOD y RADOSTITS, 1992).

La elección entre la prueba de California para mastitis y la de recuento celular en leche presenta problemas en la actualidad, porque la prueba de California se comprende bien, pero requiere trabajo intensivo y existen variaciones en su interpretación. La prueba de recuento celular en leche evita estas dos desventajas, pero aún no está totalmente evaluada (THORNTON, 1983; POUTREL y LERONDELLE, 1983; CRIPPS, 1986; BLOOD y RADOSTITS, 1992).

2.5.2.- POLICIA SANITARIA

2.5.2.1.- *Medidas generales*

La prevención de las mastitis comienza con una estrecha atención a las condiciones de las instalaciones de la ganadería y medidas sanitarias (SMITH y ROGUINSKY, 1977; MANSER, 1985; CRIPPS, 1986; MILLER y BARLETT, 1991).

La higiene en el establo empieza con habitáculos lo más limpios y secos posible (SMITH y ROGUINSKY, 1977; MANSER, 1985; KLEINSCHROTH y cols., 1989). El establo, el área donde los animales duermen, y los corrales por donde se mueven los animales deben estar bien ventilados y tener un buen sistema de desagüe (McCUISTON, 1960; SMITH y ROGUINSKY, 1977; MANSER, 1985).

Así se obtienen ubres limpias, menor presión microbiana y se consigue disminuir los costes de limpieza de la ubre antes del ordeño (SMITH y ROGUINSKY, 1977; BAXENDELL, 1985; MANSER, 1985;

KLEINSCHROTH y cols., 1989; CULLOR y cols., 1990; MILLER y BARLETT, 1991).

Los desechos y restos de alambres deben de eliminarse de los pastos o de los comederos, así como todos aquellos factores de riesgo que puedan dañar a las ubres (**SMITH y ROGUINSKY, 1977; BAXENDELL, 1985; MANSER, 1985).**

Todos los animales deben ser descornados, y las pezuñas deben recortarse con cierta frecuencia para de este modo reducir los riesgos de traumas a las ubres. Además todos aquellos animales con abscesos drenantes deben estar aislados o bien ser desechados (**SMITH y ROGUINSKY, 1977; BAXENDELL, 1985; MANSER, 1985; KLEINSCHROTH y cols., 1989).**

2.5.2.2.- Higiene del ordeño

El procedimiento del ordeño y la higiene del mismo también es un factor muy importante (**MANSER, 1985; CRIPPS, 1986; HOWARD y cols., 1987; KLEINSCHROTH y cols., 1989; BLOOD y RADOSTITS, 1992).**

Se han desarrollado unos programas de higiene durante el ordeño especialmente con destino a ganaderías con problemas de contenido celular y microbiano de la leche (**SMITH y ROGUINSKY, 1977; BAXENDELL, 1985; MANSER, 1985; NATIONAL MASTITIS COUNCIL, 1987; KLEINSCHROTH y cols., 1989; BLOOD y RADOSTITS, 1992).**

*** Limpieza de los pezones antes del ordeño**

Si, tal como se recomienda, se limpia los pezones con un papel desechable humectado con una solución desinfectante, la piel del pezón es "pobre en gérmenes" (**NATZKE y cols., 1972; BAXENDELL, 1985; MANSER, 1985; CRIPPS, 1986; HOWARD y cols., 1987; KLEINSCHROTH y cols., 1989; MILLER y BARLETT, 1991).**

La transmisión de agentes causales de la mastitis por la pezonera de

la ordeñadora, queda fuertemente reducida (SMITH y ROGUINSKY, 1977; BAXENDELL, 1985; MANSER, 1985; KLEINSCHROTH y cols., 1989; MILLER y BARLETT, 1991; BLOOD y RADOSTITS, 1992).

El contenido inicial de bacterias de la leche disminuye en un 75 p. 100 si se aplica la limpieza húmeda desinfectante. Esto reviste gran importancia cuando se trata de producir de un modo continuo leche de alta calidad (NATZKE y cols., 1972; KLEINSCHROTH y cols., 1989; CULLOR y cols., 1990). Además, se eliminan en gran parte los microorganismos esporulados que dificultan la elaboración de la leche (KLEINSCHROTH y cols., 1989; CULLOR y cols., 1990).

La limpieza húmeda desinfectante como medio para disminuir el número de gérmenes es ineficaz sin embargo, si no se limpia la instalación de ordeño de forma correcta y ordenada (SMITH y ROGUINSKY, 1977; BAXENDELL, 1985; MANSER, 1985; CRIPPS, 1986; KLEINSCHROTH y cols., 1989).

Las pezoneras que se han desprendido y se hallan en el suelo donde se encuentran los animales, han de ser lavadas con agua abundante antes de volver a ensamblarlas a los pezones (KLEINSCHROTH y cols., 1989; CULLOR y cols., 1990).

** Baño del pezón después del ordeño*

En todas las ganaderías, especialmente en las que el número de glóbulos blancos en la leche sea elevado, o en las que las mastitis son recidivantes, los pezones deben sumergirse en una solución desinfectante apropiada inmediatamente después de quitar las pezoneras (NATZKE y cols., 1972; SMITH y ROGUINSKY, 1977; BAXENDELL, 1985; MANSER, 1985; KLEINSCHROTH y cols., 1989; CULLOR y cols., 1990; POUTRL y cols., 1990; BLOOD y RADOSTITS, 1992). De esta forma se destruyen los microorganismos del pezón (CRIPPS, 1986; KLEINSCHROTH y cols., 1989; CULLOR y cols., 1990; MILLER y BARLETT, 1991).

También los pezones de los animales que se encuentren en el periodo de secado y en los últimos meses de gestación conviene que sean lavados una

REVISION BIBLIOGRAFICA

vez al día, puesto que alrededor del 70 p. 100 de las nuevas infecciones se producen durante el reposo de la lactación (KLEINSCHROTH y cols., 1989; CULLOR y cols., 1990).

Para el lavado de los pezones sólo deben utilizarse los desinfectantes autorizados, como los preparados conteniendo yodo y compuestos protectores de la piel (BAXENDELL, 1985; CRIPPS, 1986; HOWARD y cols., 1987; KLEINSCHROTH y cols., 1989; CULLOR y cols., 1990; POUTREL y cols., 1990).

** Orden a seguir en el ordeño*

Para impedir la transmisión de agentes patógenos a los animales sanos y la propagación de sustancias inhibitoras en la leche de la ganadería, es preciso seguir un orden durante el ordeño (BAXENDELL, 1985; CRIPPS, 1986; KLEINSCHROTH y cols., 1989; CULLOR y cols., 1990; BLOOD y RADOSTITS, 1992).

Cuando se lleva a cabo el ordeño conviene empezar con los animales jóvenes y sanos. A continuación se deben ordeñar los animales con trastornos de salud de la ubre y al final se ordeñan los animales que han sido sometidos a tratamiento farmacológico y cuya leche no se puede comercializar (BAXENDELL, 1985; CRIPPS, 1986; KLEINSCHROTH y cols., 1989; CULLOR y cols., 1990).

Respetando este orden se evita la transmisión de agentes patógenos de la mastitis a los pezones de los animales sanos (BAXENDELL, 1985; CRIPPS, 1986; KLEINSCHROTH y cols., 1989; CULLOR y cols., 1990). Además queda anulada la propagación de sustancias antimicrobianas (medicamentos antibióticos y otros) mediante restos de leche, procedente de animales tratados, en las pezoneras (KLEINSCHROTH y cols., 1989; CULLOR y cols., 1990; BLOOD y RADOSTITS, 1992).

Muchas veces en la práctica es imposible seguir el orden indicado. Pero, en todo caso, deben ordeñarse separadamente los animales con ubres enfermas y aquellos tratados con medicamentos (SMITH y ROGUINSKY, 1977; BAXENDELL, 1985; MANSER, 1985).

REVISION BIBLIOGRAFICA

Las pezoneras con las que se ha ordeñado leche conteniendo medicamentos o que se han colocado a animales con ubres enfermas, han de ser lavadas a fondo, antes de volver a utilizarlas en los animales siguientes (MANSER, 1985; CRIPPS, 1986; KLEINSCHROTH y cols., 1989).

Cuando se incorporan nuevos animales en el colectivo se debe analizar muestras de su leche previamente a su incorporación al procesado del ordeño, especialmente si existen problemas locales de infecciones por *Streptococcus agalactiae* y *Mycoplasma spp.* (SMITH y ROGUINSKY, 1977; KLEINSCHROTH y cols., 1989).

** Limpieza y desinfección de la instalación de ordeño*

La causa más frecuente de las impurezas en la leche cruda son una instalación y una máquina de ordeño con deficiente limpieza y desinfección (MANSER, 1985; CRIPPS, 1986; KLEINSCHROTH y cols., 1989).

Aproximadamente el 90 p. 100 del contenido total de bacterias de la leche cruda procede de las instalaciones de ordeño, mientras que la proporción de otras causas (inflamaciones en la ubre, etc.) asciende a alrededor del 10 p. 100 (KLEINSCHROTH y cols., 1989; BLOOD y RADOSTITS, 1992).

En instalaciones insuficientemente limpias, las bacterias bien adaptadas al medio se multiplican con tal rapidez durante el periodo entre un ordeño y otro que la leche recién ordeñada, normalmente pobre en bacterias, presenta una fuerte carga microbiana (MANSER, 1985; CRIPPS, 1986; KLEINSCHROTH y cols., 1989).

Una limpieza y desinfección eficaz de la instalación de ordeño es condición indispensable para obtener bajo nivel de bacterias, y disminuye el peligro de la transmisión de agentes patógenos que originan enfermedades en la ubre (SMITH y ROGUINSKY, 1977; BAXENDELL, 1985; MANSER, 1985; KLEINSCHROTH y cols., 1989; CULLOR y cols., 1990; MILLER y BARLETT, 1991; BLOOD y RADOSTITS, 1992).

REVISION BIBLIOGRAFICA

** Mantenimiento de las instalaciones de ordeño*

Las instalaciones de ordeño están sometidas, al igual que todas las máquinas, a un desgaste paulatino, creciente, en función de su antigüedad. Sus repercusiones de un periodo de ordeño al siguiente son tan insignificantes, que no son advertidas por el ordeñador (BAXENDELL, 1985; MANSER, 1985; KLEINSCHROTH y cols., 1989; CULLOR y cols., 1990; BLOOD y RADOSTITS, 1992).

De ahí que sea necesario someter la instalación de ordeño a una revisión periódica por medio de pruebas mecánicas que han de repetirse anualmente (BAXENDELL, 1985; MANSER, 1985; KLEINSCHROTH y cols., 1989; CULLOR y cols., 1990; BLOOD y RADOSTITS, 1992). Este control es al mismo tiempo una importante medida preventiva para poner coto a las enfermedades de la ubre que pudieran ser consecuencia del funcionamiento defectuoso de la máquina (SMITH y ROGUINSKY, 1977; BAXENDELL, 1985; MANSER, 1985; KLEINSCHROTH y cols., 1989; CULLOR y cols., 1990; BLOOD y RADOSTITS, 1992).

2.5.2.3.- Sacrificio de animales

Las medidas terapéuticas tienen que ir unidas a la detección y eliminación de las causas predisponentes y a la práctica de medidas higiénicas de prevención (ANDERSON, 1982; O'BRIEN, 1982; DODD, 1983; THORNTON, 1983; MANSER, 1985; CULLOR y cols., 1990; BLOOD y RADOSTITS, 1992).

Si estas normas no se llevan a cabo el número de reinfecciones y nuevas infecciones superará en poco tiempo al de curaciones (DODD, 1983; MANSER, 1985; CRIPPS, 1986; KLEINSCHROTH y cols., 1989).

Los rebaños infectados requieren un saneamiento intenso que alcancen meses o años, según los casos. Para ello, el cuidador de los animales, el veterinario y el servicio de saneamiento han de elaborar un plan adecuado (KLEINSCHROTH y cols., 1989; CULLOR y cols., 1990; BLOOD y RADOSTITS, 1992).

REVISION BIBLIOGRAFICA

La primera medida es el registro de los animales enfermos y la eliminación de los incurables. Hay que corregir todas las deficiencias relacionadas con el ordeño. Los tratamientos medicamentosos se deben hacer durante el tiempo preciso y han de estar apoyados por las medidas higiénicas de rutina (DODD, 1983; THORNTON, 1983; MANSER, 1985; CRIPPS, 1986; CULLOR y cols., 1990; BLOOD y RADOSTITS, 1992).

En todo caso, es imprescindible contar con la colaboración del personal que cuida los animales y, muy especialmente, con un veterinario experimentado en la lucha contra las mastitis. Sólo de este modo se puede vencer la infección (KLEINSCHROTH y cols., 1989; BLOOD y RADOSTITS, 1992).

Una de las medidas más efectivas para mantener y mejorar el estado sanitario del ganado lechero consiste en eliminar los animales incurables. Estos animales son una fuente de propagación de bacterias y constituyen un gran riesgo de infección (O'BRIEN, 1982; DODD, 1983; CRIPPS, 1986; KLEINSCHROTH y cols., 1989; CULLOR y cols., 1990; BLOOD y RADOSTITS, 1992).

Pueden considerarse como incurables los animales que:

* presentan en las ubres nódulos palpables o alteraciones permanentes (KLEINSCHROTH y cols., 1989; CULLOR y cols., 1990).

* muestran las alteraciones anteriores y a la vez siguen padeciendo la infección, a pesar del tratamiento instaurado (presencia de microorganismos en las muestras de leche, elevado contenido celular de la leche) (KLEINSCHROTH y cols., 1989; CULLOR y cols., 1990; BLOOD y RADOSTITS, 1992).

* dentro de un periodo de lactación, presentan en la misma glándula mamaria infecciones repetidas (CRIPPS, 1986; KLEINSCHROTH y cols., 1989; CULLOR y cols., 1990; BLOOD y RADOSTITS, 1992).

* no pueden ser curados, a pesar de las medidas de tratamiento llevadas a cabo durante el periodo de secado o en la lactación (CRIPPS,

REVISION BIBLIOGRAFICA

1986; KLEINSCHROTH y cols., 1989; CULLOR y cols., 1990).

Las cabras infectadas con *Mycoplasma spp.* deben ser aisladas o eliminadas debido al riesgo de transmisión a los animales sanos (**RUHNKE y cols., 1983; BLIKSLAGER y ANDERSON, 1992).**

El conocimiento a tiempo del número de animales enfermos y la separación de los incurables disminuirá considerablemente el riesgo de mastitis en una zona concreta (**CRIPPS, 1986; KLEINSCHROTH y cols., 1989; CULLOR y cols., 1990; BLOOD y RADOSTITS, 1992).**

II.3.- DIAGNOSTICO DE LA MASTITIS SUBCLINICA EN LOS RUMIANTES

3.1.- METODOS INDIRECTOS

Entre los primeros estudios que se llevaron a cabo para diagnosticar mastitis subclínicas algunos autores hallaron una elevada correlación entre las mastitis subclínicas y la conductividad eléctrica de la leche en estas condiciones, por lo que concluyeron que era un método preciso y rápido para llevar a cabo el diagnóstico de las infecciones intramamarias (MALCOLM y cols., 1942; DAVIS, 1947). Sin embargo estudios posteriores fueron incapaces de confirmar tales resultados (JONES, 1949; LITTLE, y cols., 1968).

En otros estudios se ha observado que la leche recogida después del ordeño incrementa los niveles de la conductividad eléctrica si se compara con la leche recogida antes del ordeño de las ubres del mismo animal (FERNANDO y cols., 1981). En contraste, la aplicación de la conductividad eléctrica para evaluar la leche mastítica o anormal en cabras no se muestra tan fiable como para la leche de vaca (PARK y NUTI, 1985; PARK, 1991).

Los tests para determinar la existencia de glóbulos blancos en la leche (test de Schalm, test de Frieso, test antigérmens, etc.) permiten efectuar unos controles rápidos y eficaces en beneficio de los granjeros, los asesores y los veterinarios para detectar indirectamente la presencia de glóbulos blancos en la leche y emitir un dictamen sobre la salud de la ubre (KLEINSCHROTH y cols., 1989; CULLOR y cols., 1990; BLOOD y RADOSTITS, 1992).

3.1.1.- PRUEBA DEL CALIFORNIA MASTITIS TEST

REVISION BIBLIOGRAFICA

O. W. SCHALM y NOORLANDER (1957), ante la necesidad de aplicar un test rápido y fiable para la detección de leche anormal, realizando la lectura en el establo junto al animal, debiendo hacerse esta lectura de forma instantánea y suficientemente bien definida como para no dejar dudas entre la presencia de una leche normal y una anormal, intentaron hacer una adaptación de los fenómenos de WHITESIDE (1939) a esas necesidades.

Una modificación del *test de Whiteside* había sido realizada por J. M. MURPHY y cols. (1941), y el llevar el *test de Whiteside* al lado del animal fue sugerido por O. W. SCHALM y NOORLANDER (1955).

O. W. SCHALM y NOORLANDER (1957) desarrollaron el *California Mastitis Test* después de numerosos ensayos con un número diverso de agentes tensoactivos, concluyendo que la reacción se podía acelerar cuando la leche con un elevado contenido celular se ponía en contacto con el sodio o sales potásicas en las concentraciones adecuadas.

Además del empleo de un agente tensoactivo aniónico con un pH próximo a la neutralidad, el uso de un indicador, tal como el púrpura de bromocresol, podía añadir la revelación de una acidificación o alcalinización anormal de la leche y, al mismo tiempo obtener un color de contraste que permitiera la lectura de la reacción (SCHALM y NOORLANDER, 1957).

De este modo, el púrpura de bromocresol (dibromo-*o*-cresolsulfonaftalina) aplicado en una concentración final de 1:10.000 proveía un buen contraste de color en la leche frente a un fondo blanco (SCHALM y NOORLANDER, 1957).

O. W. SCHALM y NOORLANDER (1957), recomendaron que el *California Mastitis Test* se debía de aplicar sólo durante el periodo de lactación activa y que era mejor no aplicar dicho test hasta el tercer día después del parto y tampoco una vez que el periodo de secado hubiese comenzado.

Tanto las leches calostrales como las secreciones de la glándula en el periodo de secado presentan un elevado contenido celular, y por lo tanto, pueden manifestar reacciones falsas positivas al *California Mastitis Test* (SCHALM y NOORLANDER, 1957; SMITH y ROGUINSKY, 1977; AVILA y cols., 1982; MAISI, 1990b; MAISI y RIIPINEN, 1991).

Después de este periodo calostrual, los niveles del *California Mastitis Test* de las ubres infectadas permanecen elevados, mientras que los valores de las ubres sanas declinan a niveles menores dentro de las primeras semanas de la lactación (MAISI, 1990a; MAISI, 1990b), alcanzando los niveles mínimos en los estadíos intermedios de la lactación y luego va incrementándose lentamente hasta las etapas finales de dicho periodo (AVILA y cols., 1982; THORNTON, 1983; MAISI, 1990a; MAISI, 1990b).

Además de estas variaciones, también se han observado ciertas diferencias al comparar entre diversos grupos de edades de animales frente al *California Mastitis Test*, siendo las cabras más jóvenes las que presentan los valores más bajos (MAISI, 1990a).

Aunque el *California Mastitis Test* fue desarrollado para su uso en los establos, también podía usarse en el laboratorio (SCHALM y NOORLANDER, 1957). En tal caso, debido a que el crecimiento bacteriano en la leche puede destruir el factor o los factores que establecen la reacción positiva con el *California Mastitis Test* se recomienda que esas muestras de leche se transporten al laboratorio refrigeradas para controlar el crecimiento bacteriano (SCHALM y NOORLANDER, 1957). Además la realización del test debe aplicarse dentro de las 24 a 36 horas después de recogidas las muestras para la obtención de los mejores resultados (SCHALM y NOORLANDER, 1957).

P. T. JENSEN (1957, cit. Cullen (1966)) demostró que la reacción de *Whiteside* era debida al efecto de la combinación de los leucocitos e iones de calcio, los cuales formaban un precipitado, mientras que la reacción en el *California Mastitis Test* era debida únicamente a la formación de un gel de proteínas de los leucocitos, y era por lo tanto más específico.

El *California Mastitis Test* mostrado por O. W. SCHALM y NOORLANDER (1957) presentaba pues, una buena correlación en el conteo total de leucocitos y de polimorfonucleares (CULLEN, 1966).

Numerosos autores han comprobado que los conteos de células somáticas en leche normal de cabras presentan unos niveles mayores que los obtenidos en la leche de vacas (CARUOLO, 1974; PAAPE y cols., 1977; SMITH y ROGUINSKY, 1977; FARNSWORTH, 1979; FARNSWORTH y cols., 1979; MELLENBERGER, 1979; GROOTENHUIS, 1980;

REVISION BIBLIOGRAFICA

LOWENSTEIN y cols., 1980; DULIN y cols., 1982; POUTREL y LERONDELLE, 1983; DROKE y cols., 1993).

Sin embargo, se ha indicado que los niveles de lectura con el *California Mastitis Test* que reflejan los contajes de neutrófilos en leche de cabra son similares a los encontrados en la leche del ganado bovino (SCHALM y cols., 1971; MELLENBERGER, 1979; PETTERSEN, 1981; COLLINS y cols., 1982; POUTREL y LERONDELLE, 1983).

Esto es debido, a que el incremento que se produce con el *California Mastitis Test* normalmente es debido a una elevación en el número de neutrófilos y las estructuras citoplásmicas redondas resultantes de la secreción apocrina que están presentes en la leche de cabra no reaccionan con el reactivo de dicho test (SCHALM y cols., 1971; DULIN y cols., 1982; THORNTON, 1983).

Los estudios del examen ultraestructural y citoquímico de la leche de cabra han revelado que dichas partículas citoplásmicas invariablemente carecen de núcleo (WOODING y cols., 1970; DULIN y cols., 1982), y por definición no deben incluirse en los contajes de células somáticas en la leche (DULIN y cols., 1982).

Estas partículas contenidas en la leche de cabra no reaccionan con el *California Mastitis Test* pero sin embargo, pueden ser contadas por un contador de partículas electrónico (SCHALM y cols., 1971; HUNTER, 1984). Tienen un tamaño aproximado a los linfocitos presentes en la leche y no se observan en preparaciones teñidas de muestras de leches de vacas (KERNOHAN y THOMPSON, 1977 (cit. por HUNTER (1984))).

El *California Mastitis Test* ha sido uno de los métodos indirectos más ampliamente utilizado para propósitos rutinarios en el laboratorio así como en condiciones de campo tanto en el ganado vacuno (DODD, 1983; KLEINSCHROTH y cols., 1989; CULLOR y cols., 1990; BLOOD y RADOSTITS, 1992), ovino (DODD, 1983; CULLOR y cols., 1990) como en el ganado caprino (SMITH y ROGUINSKY, 1977; POUTREL, 1984; BAXENDELL, 1985; MANSER, 1985; CRIPPS, 1986; MAISI, 1990b; MAISI y RIIPINEN, 1991).

A pesar de ello, al ser el *California Mastitis Test* un método subjetivo

REVISION BIBLIOGRAFICA

presenta las limitaciones propias de dicho caracter (PETTERSEN, 1981).

M. C. SMITH y ROGUINSKY (1977) estudiaron la aplicación del *California Mastitis Test* en el ganado caprino obteniendo los siguientes valores del número de neutrófilos por mililitro a los distintos niveles de lectura de la reacción:

- * 0: 68.000 neutrófilos/ml
- * +/-: 268.000 neutrófilos/ml
- * 1: 800.000 neutrófilos/ml
- * 2: 2.560.000 neutrófilos/ml
- * 3: 10.000.000 neutrófilos/ml

Se ha indicado que las reacciones cuarta y quinta son las realmente importantes en el ganado caprino, ya que la leche normal de cabra puede dar reacciones del nivel segundo y tercero (SMITH y ROGUINSKY, 1977; AVILA y cols., 1982; MAISI, 1990b; MAISI y RIIPINEN, 1991).

Aunque el *California Mastitis Test* es considerado como un buen indicador en las ubres libres de infección, en determinadas circunstancias se producen niveles elevados a la lectura de la reacción que no siempre indican infección (THORNTON, 1983; AVILA y cols., 1982; MAISI, 1990b; MAISI y RIIPINEN, 1991).

Es por ello, que diversos autores recomiendan que un nivel al *California Mastitis Test* a partir del cuarto es indicativo de infección, y que la reacción de nivel tercero debe sugerir sospecha de infección (AVILA y cols., 1982; MAISI, 1990b; MAISI y RIIPINEN, 1991; KALOGRIDOU-VASSILIADOU y cols., 1992).

En los diferentes estudios llevados a cabo para valorar la cuestionada patogenicidad de las infecciones por estafilococos coagulasa-negativos se ha observado que la mayoría de estas infecciones producen aumentos

significativos a la lectura de reacción del *California Mastitis Test* (POUTREL y LERONDELLE, 1983; HINCKLEY y cols., 1985; MAISI, 1990b; MAISI y RIIPINEN, 1991; KALOGRIDOU-VASSILIADOU y cols., 1992).

3.2.- METODOS DIRECTOS

3.2.1.- MICROBIOLOGICOS

El diagnóstico de las mastitis subclínicas se ha basado fundamentalmente en el aislamiento de los microorganismos presentes en la leche (POUTREL y LERONDELLE, 1983; KALOGRIDOU-VASSILIADOU, 1991; MAISI y RIIPINEN, 1991; PARK, 1991; KALOGRIDOU-VASSILIADOU y cols., 1992). Sin embargo, los exámenes bacteriológicos requieren personal cualificado, tiempo y dinero.

A pesar de ello, es un método imprescindible en los estudios llevados a cabo para valorar las diferentes técnicas de diagnóstico del estado de infección de la glándula mamaria. Es por ello que indistintamente los diversos autores han aplicado exámenes bacteriológicos básicos muy similares (INTERNATIONAL DAIRY FEDERATION, 1981; POUTREL y LERONDELLE, 1982; POUTREL y LERONDELLE, 1983; HUNTER, 1984; HINCKLEY y cols., 1985; MAISI y RIIPINEN, 1991; PARK, 1991; KALOGRIDOU-VASSILIADOU, 1992).

Para realizar un examen bacteriológico concluyente es necesario obtener muestras de leche por ordeño separado de cada glándula mamaria, adoptando las máximas medidas higiénicas. Siendo preciso que no existan gérmenes en las proximidades del animal que puedan llegar a la muestra extraída. Si no es así, las bacterias de la suciedad ambiental dificultarán el análisis y su resultado (POUTREL y LERONDELLE, 1983; HUNTER, 1984; HINCKLEY y cols., 1985; KLEINSCHROTH y cols., 1989; MAISI y RIIPINEN, 1991; PARK, 1991; KALOGRIDOU-VASSILIADOU, 1992).

La extracción de leche ha de hacerse indispensablemente en tubos estériles, de plástico, de un solo uso. Inmediatamente después de la extracción, se refrigeran las muestras para su envío hasta el laboratorio

REVISION BIBLIOGRAFICA

(POUTREL y LERONDELLE, 1983; HUNTER, 1984; HINCKLEY y cols., 1985; KLEINSCHROTH y cols., 1989; MAISI, 1990b; KALOGRIDOU-VASSILIADOU y cols., 1991; PARK, 1991; KALOGRIDOU-VASSILIADOU y cols., 1992).

Estos exámenes consisten en sembrar cada muestra de leche en ágar sangre e incubar durante 24-48 horas a 37°C. Colonias bien aisladas se examinan microscópicamente utilizando la tinción de *Gram*, y pruebas complementarias tales como la de la catalasa y coagulasa (POUTREL y LERONDELLE, 1983; HUNTER, 1984; POUTREL, 1984; HINCKLEY y cols., 1985; PARK y HUMPHREY, 1986; KALOGRIDOU-VASSILIADOU, 1991; MAISI y RIIPINEN, 1991; KALOGRIDOU-VASSILIADOU y cols., 1992). Otros medios básicos empleados son McConkey para la detección de gérmenes coliformes (HUNTER, 1984; PARK y HUMPHREY, 1986; PARK, 1991), Baird-Parker para estafilococos (POUTREL, 1984; PARK, 1991) o medios específicos para levaduras y/o micoplasmas (SHELDRAKE y cols., 1981; HUNTER, 1984; KALOGRIDOU-VASSILIADOU, 1991).

Para la identificación de las diversas cepas de especies aisladas el sistema más ampliamente utilizado ha sido las galerías de identificación API (MAISI, 1990b; KALOGRIDOU-VASSILIADOU, 1991; MAISI y RIIPINEN, 1991).

En la práctica, para el control higiénico de la leche se ha sugerido que la leche de cabra tomada directamente de las ubres se considera libre de infección cuando no se exceden de cinco unidades formadoras de colonias por diez microlitros de leche (POUTREL, 1984; HINCKLEY y cols., 1985; MANSER, 1986).

Los *Staphylococcus aureus* son la especie más frecuente de patógenos mayores responsables de las mastitis caprinas, y al contrario que ocurre en el vacuno las infecciones por *Streptococcus spp.* son extremadamente raras (HUNTER, 1984; BAXENDELL, 1985; MANSER, 1986; EAST y cols., 1987; KALOGRIDOU-VASSILIADOU, 1991).

En estudios llevados a cabo para evaluar la patogenicidad de diferentes especies de estafilococos en la ubre caprina en los cuales se han valorado diversos parámetros de base inflamatoria tales como la actividad ante el *California Mastitis Test*, NAGasa y antitripsina, se ha observado que

REVISION BIBLIOGRAFICA

Staphylococcus aureus es la infección estafilocócica de mayor patogenicidad tanto en formas clínicas y subclínicas en la ubre caprina (MELLENBERGER, 1979; MANSER, 1986; MAISI y RIIPINEN, 1991).

Frente a estos parámetros inflamatorios, P. MAISI y RIIPINEN (1991) observaron que *Staphylococcus hyicus* mostraba sólo una patogenicidad marginal y el resto de las especies de estafilococos presentaban patogenicidad intermedia. A pesar de que estos autores consideran a *Staphylococcus hyicus* un patógeno menor debido a sus estudios basados en parámetros inflamatorios, esta especie ha sido aislada de cultivos puros de cabras que padecían mastitis clínicas lo cual indica que esta bacteria posee potencial patogénico (POUTREL, 1984; FERRER y cols., 1993).

También se observa una elevada incidencia de estafilococos coagulasa-negativos comparada con los encontrados en el ganado vacuno, aunque las opiniones difieren en cuanto a su significado con relación a la salud de la ubre (PEREZ y SCHULTZ, 1979; PETTERSEN, 1981; SHELDRAKE y cols., 1981; HUNTER, 1984; POUTREL y LERONDELLE, 1984; KALOGRIDOU-VASSILIADOU y cols., 1992).

Las especies de estafilococos que producen la hemólisis de los eritrocitos en los medios de cultivos de laboratorio han sido, en el pasado, identificados como productores de mastitis (LITTLE y PLASTRIDGE, 1946). Posteriormente estos estafilococos se han considerado como microorganismos no patógenos en la leche tanto de bovinos como de caprinos (PEREZ y SCHULTZ, 1979; HUNTER, 1984).

Basándose en evidencias más recientes sobre la inducción de irritación de estas bacterias en la ubre y de producir bajos niveles en los contajes de leucocitos, se han clasificado para el ganado vacuno a los estafilococos no hemolíticos como patógenos menores (SCHULTZ y cols., 1978; HINCKLEY y cols., 1985; CULLOR y cols., 1990).

Sin embargo, algunos estudios han indicado que los estafilococos coagulasa-negativos no hemolíticos pueden ser más patogénicos en las ubres caprinas que en las del vacuno (GUSS, 1977; SMITH y ROGUINSKY, 1977; HINCKLEY y cols., 1985; MAISI, 1990b; MAISI y RIIPINEN, 1991).

Ocasionalmente los estafilococos coagulasa-negativos han sido

REVISION BIBLIOGRAFICA

consideradas bacterias implicadas en cuadros de irritación de la ubre, que se ha medido por un incremento en el contenido de células somáticas y una disminución en la producción de leche (HOLMBERG, 1973; SMITH y ROGUINSKY, 1977; HINCKLEY y cols., 1985), también en casos de mastitis crónicas y en algunos casos de mastitis severas (ROGUINSKY y cols., 1971; HOLMBERG, 1973; SMITH y ROGUINSKY, 1977; KALOGRIDOU-VASSILIADOU, 1991).

En cambio, por otro lado se ha considerado a algunas especies de estafilococos coagulasa-negativos como parte de la flora normal de la ubre caprina (IBRAHIM, (1968) cit. HUNTER (1984)) y algunos autores no encontraron diferencias significativas entre los contajes celulares de ubres libres de infección y de ubres con presencia de estafilococos coagulasa-negativos (PEREZ y SCHULTZ, 1979; PETTERSEN, 1981; SHELDRAKE y cols., 1981). Otros autores consideran que aunque estos microorganismos pueden asociarse con contajes celulares elevados sugieren que hay escasa evidencia de que sean la causa de problemas clínicos (HUNTER, 1984).

En las cabras, las mastitis producidas por estas bacterias se caracterizan por ser crónicas y con un bajo grado de inflamación, resultando en una disminución en la producción de leche (HOLMBERG, 1973; HINCKLEY y cols., 1985; MAISI, 1990b; MAISI y RIIPINEN, 1991), indicándose pues, que los estafilococos coagulasa negativos son un problema significativo para el ganado caprino (HINCKLEY y cols., 1985).

Aunque la leche procedente de glándulas afectadas por estafilococos coagulasa-negativos parezca de aspecto normal, las ubres de las cabras afectadas se encuentran más débiles (GUSS, 1977; SMITH y ROGUINSKY, 1977; HINCKLEY y cols., 1985).

La mayoría de las infecciones producidas por estas bacterias además de que persisten a través de los meses de la lactación también persisten en el periodo de secado (POUTREL, 1984; MAISI y RIIPINEN, 1991). Estos resultados no apoyan el punto de vista de que estas infecciones pueden presentarse y desaparecer de un día para otro, por lo que sugieren que se trata de verdaderas infecciones de las ubres (POUTREL, 1984; MAISI y RIIPINEN, 1991).

Estas diferencias entre ambas especies (caprina y bovina) es indicativa

REVISION BIBLIOGRAFICA

de que pueden existir otras causas de mastitis caprinas significativas que no se diagnostiquen habitualmente debido a que se siguen los mismos medios rutinarios de aislamientos de microorganismos que intervienen en los procesos de mastitis en el ganado bovino, tales son como las producidas por *Mycoplasma spp.* y por el virus de la artritis-encefalitis-caprina (ADAMS, 1980; ZWAHLEM y cols., 1983; HINCKLEY y cols., 1985; SMITH y CUTLIP, 1988; RYAN y cols., 1993), donde los medios de cultivos para estos agentes no son un procedimiento rutinario para el diagnóstico de las mastitis (HINCKLEY y cols., 1985).

En la detección de cabras infectadas con *Mycoplasma spp.* se utilizan medios de cultivos específicos como el medio de Hayflick, en los cuales se siembran las muestras de leche (COTTEW, 1982; RUHNKE y cols., 1983; BLIKSLAGER y ANDERSON, 1992).

Basándose en el hecho de que las infecciones por *Mycoplasma spp.* pueden permanecer latentes durante meses, y de que factores estresantes desencadenan la presentación de la enfermedad, es por lo que las cabras infectadas con *Mycoplasma spp.* se recomienda que se aislen o se eliminen debido al gran riesgo de transmisión que representan hacia los animales sanos (RUHNKE y cols., 1983; BAXENDELL, 1985; BLIKSLAGER y ANDERSON, 1992).

3.2.2.- RECUENTOS DE CELULAS SOMATICAS EN LECHE: FOSSOMATIC Y COULTER-COUNTER

La necesidad de disponer de medios de diagnóstico rápidos y suficientemente exactos que permitan aplicar las oportunas medidas profilácticas y terapéuticas conducentes a la erradicación de la mastitis, ha dado lugar a la aparición en los últimos años de diversos métodos basados en técnicas instrumentales, que tienen hoy día amplia utilización en el ganado bovino y son la base fundamental en que se apoyan todos los actuales planes de control de la enfermedad (CASADO y BLANCO, 1978; INTERNATIONAL DAIRY FEDERATION, 1984; KLEINSCHROTH y cols., 1989; CULLOR y cols., 1990; BLOOD y RADOSTITS, 1992).

Todos estos métodos instrumentales fundamentan su aplicación para

la detección de la mastitis en el recuento de células somáticas existentes en la leche, basándose en la relación existente entre ese recuento y el grado de enfermedad (CASADO y BLANCO, 1978; INTERNATIONAL DAIRY FEDERATION, 1984; KLEINSCHROTH y cols., 1989; CULLOR y cols., 1990; BLOOD y RADOSTITS, 1992).

Entre los principales métodos instrumentales para el recuento de células somáticas en leche más utilizados hoy en día y cuya utilización ha sido recomendada por la INTERNATIONAL DAIRY FEDERATION (1980), se encuentran los siguientes:

a) Método *Coulter-Counter*

b) Método *Fossomatic*

3.2.2.1.- *Composición celular de la leche*

Se pensaba que en la vaca (LEE y cols., 1980), cabra (WOODING y cols., 1970) y oveja (LEE y OUTERIDGE, 1976) aproximadamente el 98 p. 100 de las células que se encuentran en la leche normal eran leucocitos. Sin embargo, en la cabra (WOODING y cols., 1970; PAAPE y cols., 1980a; HINCKLEY y WILLIAMS, 1981; SHELDRAKE y cols., 1981; DULIN y cols., 1982; HINCKLEY, 1983; POUTREL y LERONDELLE, 1983) y en la oveja (SCHALM y cols., 1971) partículas similares a las células también están presentes en la leche.

Estas partículas las cuales se identifican erróneamente como macrófagos o células epiteliales, pueden constituir aproximadamente el 60 p. 100 del total del "contaje celular" en la leche normal de estas especies (PAAPE y cols., 1980a; PAAPE y cols., 1980b).

Entre las especies ruminantes, la población de leucocitos en la leche incluye los polimorfonucleares, linfocitos y macrófagos (PAAPE y cols., 1980b). A causa de que los polimorfonucleares y macrófagos son ávidos ingestores de glóbulos de grasa y caseína presentes en la leche, su morfología difiere en la leche y en la sangre (ANDERSON y cols., 1975; LEE y OUTERIDGE, 1976; PAAPE y WERGIN, 1977; RUSSELL y cols., 1977;

PAAPE y cols., 1980b).

Quando se examinan con el microscopio, estas células muestran numerosas vacuolas en sus citoplasmas. Estas vacuolas se han identificado mediante microscopía electrónica de transmisión como fagolisosomas que contienen glóbulos de grasa o partículas de caseína de la leche (ANDERSON y cols., 1975; LEE y OUTERIDGE, 1976; PAAPE y WERGIN, 1977; RUSSELL y cols., 1977; PAAPE y cols., 1980b).

Como resultado de la ingestión de grandes cantidades de grasa y de caseína, los macrófagos presentes en la leche pueden medir hasta 40 micras de diámetro (LEE y OUTERIDGE, 1976). Se llegó a afirmar que estos macrófagos o células espumosas se desprendían del epitelio secretor de la glándula mamaria (CULLEN, 1966; SCHALM y cols., 1971).

Sin embargo, los resultados de diversos estudios en oveja (LEE y OUTERIDGE, 1976) y en la vaca (JENSEN y EBERHART, 1975; LEE y cols., 1980) han demostrado que tales células espumosas presentes en la leche tienen propiedades que son comunes a los macrófagos, tales como su capacidad para ingerir colorantes, microorganismos y partículas de carbón.

Las células epiteliales también se encuentran ocasionalmente en la leche. La identificación de estas células es difícil debido a que su morfología en el microscopio se muestra similar a los macrófagos (PAAPE y cols., 1980b). Es por ello, que diversos estudios que databan sobre la concentración diferencial de células somáticas en la leche han sobreestimado el número de células epiteliales presentes en la misma (CULLEN, 1966; SCHALM y cols., 1971).

Las células epiteliales en la leche se han identificado con más precisión con la ayuda de microscopía electrónica de transmisión (LEE y OUTERIDGE, 1976; LEE y cols., 1980; PAAPE y cols., 1980b). En estos estudios, los investigadores concluyeron que menos del 2% del total de la población de células somáticas en la leche consiste en células epiteliales, las cuales probablemente tienen su origen en el sistema canalicular de la glándula mamaria (PAAPE y cols., 1980b).

En la leche de cabra, las partículas similares a células no leucocíticas (denominadas partículas citoplásmicas) se han examinado

REVISION BIBLIOGRAFICA

ultraestructuralmente así como citoquímicamente (WOODING y cols., 1970; PAAPE y cols., 1980a; PAAPE y cols., 1980b).

Estas partículas se pensaba que tenían su origen en el epitelio pero su presencia en la leche es el resultado de la secreción de tipo apocrino, la cual es la que está presente en la glándula mamaria caprina (WOODING y cols., 1970; SCHALM y cols., 1971; PAAPE y cols., 1980a; PAAPE y cols., 1980b; DULIN y cols., 1983), a diferencia de la secreción láctea de la vaca que es de tipo merocrino (SCHALM y cols., 1971).

Mediante la microscopía electrónica se ha observado que estas partículas similares a células tienen membrana y son generalmente anucleadas (PAAPE y cols., 1980b), las cuales contienen un material granular. Con tinciones histoquímicas y fluorescentes se ha mostrado que estas partículas contienen grandes cantidades de proteínas y algunos lípidos, pero no ácido desoxirribonucleico (PAAPE y cols., 1980b; DULIN y cols., 1982; POUTREL y LERONDELLE, 1983; PARK y HUMPHREY, 1986).

En el estudio llevado a cabo por A. M. DULIN y cols. (1983) acerca de los posibles factores que podían influir en la concentración de partículas citoplásmicas en la leche de cabra, observaron que su porcentaje en la leche no se afectaba significativamente ni por el estado de lactación ni por la presencia de infecciones intramamarias, pero que eran significativamente mayores en la primera lactación de los animales.

La razón de que se produzca un incremento en la concentración de las partículas citoplásmicas no está clara, pero parece ser que se podría deber al efecto de una mayor concentración de la leche, ya que los animales en su primera lactación producen menos leche (DULIN y cols., 1983).

3.2.2.2.- Variaciones del contenido celular de la leche

El contenido celular de la leche es un factor que ayuda a conocer el estado sanitario de la ubre. Un elevado contenido celular significa enfermedad de la ubre, menor producción de leche, alteración de su composición y consiguiente pérdida económica (DULIN y cols., 1983; KLEINSCHROTH y cols., 1989; CULLOR y cols., 1990; BLOOD y

RADOSTTITS, 1992).

Las influencias nocivas sobre la ubre (ordeño erróneo, frío, golpes, etc.) o la infección ocasionan un aumento considerable y rápido del número de células de la leche, como consecuencia de la llegada de gran cantidad de células defensivas, principalmente leucocitos (KLEINSCHROTH y cols., 1989; CULLOR y cols., 1990; BLOOD y RADOSTTITS, 1992).

El grado de incremento celular se halla en relación directa con la gravedad del proceso que sufre la ubre, por lo que el examen del contenido celular de la leche puede indicar su estado funcional (KLEINSCHROTH y cols., 1989; CULLOR y cols., 1990; BLOOD y RADOSTTITS, 1992).

Entre el contenido celular y la cantidad de leche existe una relación negativa. Cuanto más elevado sea el contenido celular menor será el rendimiento (DULIN y cols., 1983; MILLER y cols., 1983; JONES y cols., 1984; KLEINSCHROTH y cols., 1989; CULLOR y cols., 1990; BLOOD y RADOSTTITS, 1992).

Los contajes de células somáticas se han aceptado como el mejor índice cuantitativo de la inflamación de la glándula mamaria bovina y se utilizan tanto para evaluar la calidad de la leche como para predecir el estado de infección de la ubre (POUTREL y RAINARD, 1982; KLEINSCHROTH y cols., 1989; CULLOR y cols., 1990; BLOOD y RADOSTTITS, 1992).

Los contajes electrónicos de células somáticas son los métodos más ampliamente usados en los laboratorios. La cuestión ha sido si los diversos métodos usados rutinariamente para estimar los contajes de células somáticas y el valor umbral reconocido como normal en vacas (500.000 células/ml) pudieran aplicarse con precisión para la leche de cabra (POUTREL y LERONDELLE, 1983; PARK y HUMPHREY, 1986), lo cual ha sido motivo de controversia (ATHERTON, 1983; PARK y HUMPHREY, 1986; CULLOR y cols., 1990).

En bovinos, el número total de células somáticas en leche es indicativo de la presencia de leucocitos, lo cual se corresponde con el grado de irritación de la glándula mamaria (INTERNATIONAL DAIRY FEDERATION, 1971; POUTREL y RAINARD, 1982; KLEINSCHROTH y cols., 1989; CULLOR

y cols., 1990; BLOOD y RADOSTITS, 1992).

Diversos autores han indicado que el contaje total de células somáticas en cabras no se correlaciona con el número de leucocitos (SMITH y ROGUINSKY, 1977; HINCKLEY y WILLIAMS, 1981; SHELDRAKE y cols., 1981; DULIN y cols., 1982; HINCKLEY, 1983; PARK y HUMPHREY, 1986), ésto es debido a la secreción de la leche de cabra que al ser de tipo apocrino resulta con un elevado número de partículas esféricas citoplásmicas y de células epiteliales (WOODING y cols., 1970; SCHALM y cols., 1971; DULIN y cols., 1983; HINCKLEY, 1983).

En la leche de cabra se pueden encontrar un gran número de células epiteliales en su composición, por lo que es común hallar en la leche de esta especie elevados contajes de células somáticas cuando el número de leucocitos presentes en ella sea relativamente bajo (SMITH y ROGUINSKY, 1977; KAPTURE, 1980; SHELDRAKE y cols., 1981; DULIN y cols., 1983; HINCKLEY, 1983; PARK y HUMPHREY, 1986).

Sin embargo, ésto no ocurre en la leche de vaca debido a que el número de células epiteliales en la leche resulta insignificante y carece de partículas esféricas citoplásmicas (PARK y HUMPHREY, 1986).

Las granjas de ganado lechero caprino se han encontrado con las dificultades de la presencia de elevados niveles de contajes de células somáticas en la leche (PARK y HUMPHREY, 1986). Estos contajes, en ubres normales o infectadas se han presentado bastante más elevados que en la leche normal del ganado vacuno, especialmente al final de la lactación (OKADA, 1960; CARUOLO, 1974; SMITH y ROGUINSKY, 1977; GROOTENHUIS, 1980; PETTERSEN 1981; DULIN y cols., 1983; PARK y HUMPHREY, 1986; DROKE y cols., 1993).

El número de microorganismos patógenos presentes en la leche puede ser un índice cuantitativo de inflamación de la glándula mamaria (KAPTURE, 1980; POUTREL y LERONDELLE, 1983; PARK y HUMPHREY, 1986). Es por ello que algunos autores consideran que se debe de comparar o correlacionar el contaje de células somáticas con el número de bacterias presentes en la leche (POUTREL y LERONDELLE, 1983; PARK y HUMPHREY, 1986).

REVISION BIBLIOGRAFICA

La influencia de la infección de la ubre por estafilococos coagulasa-negativos en el contaje total de células somáticas de la leche de cabra ha sido una cuestión ampliamente debatida (ROGUINSKY y cols., 1971; HOLMBERG, 1973; SMITH y ROGUINSKY, 1977; SHELDRAKE y cols., 1981; POUTREL y LERONDELLE, 1983; MAISI y RIIPINEN, 1991; KALOGRIDOU-VASSILIADOU y cols., 1992).

Esta controversia es debida a que algunos autores recogen la presentación de un incremento del contaje de células somáticas en ubres que albergan estafilococos coagulasa-negativos (ROGUINSKY y cols., 1971; HOLMBERG, 1973; SMITH y ROGUINSKY, 1977; DULIN y cols., 1983; POUTREL y LERONDELLE, 1983; KALOGRIDOU-VASSILIADOU y cols., 1992), y sin embargo otros autores no hallaron diferencias entre las ubres infectadas y ubres libres de infección (PEREZ y SCHULTZ, 1979; PETTERSEN, 1981; SHELDRAKE y cols., 1981).

Otros factores, tales como la producción, la edad o el estado de lactación, se han considerado también importantes pero son pocos los estudios que se han hecho como para cuantificar éstos en relación a la leche de cabra (HUNTER, 1984).

Al igual que ocurre en el ganado bovino de forma fisiológica los contajes celulares aumentan hacia el final del periodo de lactación (THORNTON, 1983).

Se ha postulado, que a causa del menor volumen de leche producido por algunos animales, los efectos de la edad o el estado de lactación sobre los contajes celulares son más pronunciados que en la leche de vaca (HUNTER, 1984).

Por todo ello se ha indicado que se deben separar los estándares establecidos para la leche de vaca de los de cabra (INTERNATIONAL DAIRY FEDERATION, 1979; ATHERTON, 1983; PARK y HUMPHREY, 1986). Y aunque existan problemas de coste y viabilidad en la situación práctica de las ganaderías, es recomendable realizar la determinación de leucocitos para detectar las condiciones anormales en las leches del ganado caprino (ATHERTON, 1983; PARK y HUMPHREY, 1986).

3.2.2.3.- Método Coulter-Counter

Aunque dedicado originalmente a recuentos hematológicos (hematíes y leucocitos), el aparato *Coulter-Counter* ha encontrado aplicación en multitud de campos fuera del ámbito clínico. Tal es el caso de los recuentos sobre productos lácteos (PHIPPS, 1968; INTERNATIONAL DAIRY FEDERATION, 1971). En la industria láctea existen tres tipos de ensayos para los cuales el contador *Coulter* resulta apropiado: determinación del número y tamaño de los glóbulos grasos, recuento de leucocitos y recuentos bacterianos.

El número de células somáticas en la leche se ha determinado durante muchos años con el método clásico a microscopio publicado por S. C. PRESCOTT y BREED (1910).

Trabajos posteriores en busca de una solución más rápida y exacta al problema de los recuentos leucocitarios usaron contadores de partículas (*Coulter-Counter*), sobre el cual A. TOLLE y cols. (1966) publicaron un método para la determinación electrónica del contenido celular en la leche.

Para que el *Coulter-Counter* sólo contara células en la leche entera se debía de tomar la precaución de eliminar los glóbulos grasos, cuyo tamaño podía ser del mismo orden que las células somáticas y, en consecuencia, podrían dar lugar a recuentos erróneos por exceso (TOLLE y cols., 1966; PHIPPS, 1968). Estas partículas de grasa se podían evitar mediante la centrifugación de la leche diluída con solución salina (CULLEN, 1965; PHIPPS y NEWBOULD, 1966; READ y cols., 1967) o bien se podían dispersar por medio de tratamiento químico de la leche (TOLLE y cols., 1966).

El método químico requería que la muestra de leche se tratara con formalina (1/500) durante veinticuatro horas, lo cual suministraba resistencia a las células (TOLLE y cols., 1965). Para ello había que mezclar en caliente esta leche con formalina con un agente tensoactivo y alcohol en solución salina, con la que se consigue disolver la grasa, y por lo tanto las muestras se podían contar una vez se hubiesen enfriado a temperatura ambiente

REVISION BIBLIOGRAFICA

(TOLLE y cols., 1965; PHIPPS, 1968; GRAPPIN y JEUNET, 1971; PHILPOT y PANKEY, 1973).

Aunque la experiencia llevada a cabo por diverso número de investigadores mostraba que la precisión y reproductibilidad de los contajes celulares llevados a cabo con los métodos existentes para la eliminación de los glóbulos de grasa en la leche eran similares (**DIJKMAN y cols., 1966; PHIPPS, 1968; PEARSON y cols., 1970**), algunos autores se decantaron por el método químico (**PEARSON y cols., 1970; GRAPPIN y JEUNET, 1971; PHILPOT y PANKEY, 1973**).

J. K. L. PEARSON y cols. (1970) determinaron que el método químico revelaba un mayor coeficiente de correlación con el contaje de microscopio directo que el revelado con el método de centrifugación. La correlación mostrada entre ambos métodos fue de 0'988.

Este método, el cual fue el resultado de los trabajos llevados a cabo por **A. TOLLE y cols. (1966)** y **H. ZEIDER y cols. (1968a, 1968b)** es el que recomendaron **J. K. L. PEARSON y cols. (1970)**, en el procedimiento que propusieron para la determinación del contaje de células somáticas en la leche.

Sobre estos estudios, se concibieron las bases de los procedimientos recomendados para el recuento de células somáticas en la leche que fue adoptado por la **INTERNATIONAL DAIRY FEDERATION (1971)**, que fue aceptado como el procedimiento de mayor valor aplicable como método rutinario en el contaje de células somáticas de un gran número de muestras de leche.

En el seminario de la **INTERNATIONAL DAIRY FEDERATION (1975)** sobre el Control de las Mastitis, se acordó que se debían requerir más trabajos de investigación para estandarizar los métodos utilizados en los distintos laboratorios.

De los diversos estudios realizados por los investigadores para determinar los contajes medios celulares mediante *Coulter-Counter* en la leche de cabra de ubres sanas al principio y en estadíos intermedios de la lactación, los resultados han sido: de 675×10^3 células/ml (**DULIN y cols., 1982**), 1404×10^3 células/ml (**SHELDRAKE, 1981; POUTREL y cols., 1983**;

LERONDELLE y POUTREL, 1984).

Otros autores no dan medias tan limitadas, ya que en sus estudios han hallado que los contajes celulares en la leche de cabra son extremadamente variables y generalmente mucho mayores que los contajes celulares obtenidos en leche de vacas (SMITH y ROGUINSKY, 1977; PEREZ y SCHULTZ, 1979; GROOTENHUIS, 1980; HUNTER, 1984).

Así por ejemplo M. C. SMITH y ROGUINSKY (1977) establecieron la siguiente guía general para la interpretación de mastitis del ganado caprino: contajes inferiores a un millón/ml representan glándulas sanas o con una ligera irritación; de 500.000 a 2 millones de células/ml sugerían la presencia de microorganismos no patógenos o ligeramente patógenos; y contajes superiores a 1'5 millones/ml son indicativos de la presencia de microorganismos patógenos, siendo los más frecuentes *Staphylococcus spp.*

Otros como A. C. HUNTER (1984) obtuvieron que aproximadamente un tercio de las muestras de leche de cabras analizadas se excedían de 2.000.000 de células/ml, porcentajes algo mayores que los obtenidos por G. GROOTENHUIS (1980) y M. PEREZ y SCHULTZ (1979).

Los contajes celulares en cabras se pueden presentar con valores muy variables que se han situado por debajo de 500.000 células/ml (19-47% de las muestras) (PEREZ y SCHULTZ, 1979; GROOTENHUIS, 1980; THORNTON, 1983; HUNTER, 1984), entre 500.000 y 1.000.000 de células/ml (17-25% de las muestras) (PEREZ y SCHULTZ, 1979; GROOTENHUIS, 1980; THORNTON, 1983; HUNTER, 1984) y entre 1.000.000 y 2.000.000 células/ml (21-34% de las muestras) (PEREZ y SCHULTZ, 1979; GROOTENHUIS, 1980; THORNTON, 1983; HUNTER, 1984).

También se ha observado que existen diferencias significativas cuando se comparan las medias de contajes celulares entre rebaños distintos (NESBAKKEN, 1976; LERONDELLE y POUTREL, 1984; CAPUCO y cols., 1986). Posiblemente debidos a diferentes medidas de manejo, condiciones sanitarias o estado de infección (NESBAKKEN, 1976; LERONDELLE y POUTREL, 1984). Sin embargo, dentro del mismo rebaño las variaciones son menos pronunciadas (SHELDRAKE y cols., 1981; CAPUCO y cols., 1986).

REVISION BIBLIOGRAFICA

Los resultados de los diversos estudios llevados a cabo apoyan el punto de vista de que las infecciones de la ubre con patógenos, y en ocasiones con microorganismos generalmente considerados como de baja patogenicidad, son la principal causa del aumento de los niveles de los contajes celulares (PEREZ y SCHULTZ, 1979; GROOTENHUIS, 1980; HUNTER, 1984).

La INTERNATIONAL DAIRY FEDERATION (1979; 1981) ha aceptado el contaje de células somáticas como el mejor índice cuantitativo de inflamación en la glándula mamaria bovina; el valor límite reconocido ha sido de 500.000 células por mililitro en una muestra recogida de un cuarterón individual.

En estudios realizados en el ganado caprino, se ha obtenido que el umbral de mayor discriminación para el diagnóstico de ubres infectadas era de un contaje celular de 1.000.000 de células/ml (LERONDELLE y POUTREL, 1984). Usando este valor, el 72 p. 100 de infecciones producidas por patógenos mayores fueron diagnosticadas y sólo un 18 p. 100 de infecciones producidas por estafilococos coagulasa-negativos (LERONDELLE y POUTREL, 1984).

Aunque el 19 p. 100 de las infecciones por patógenos mayores no fueron diagnosticadas, este umbral no se considera demasiado malo para el diagnóstico de las mastitis subclínicas comparándolo con los resultados obtenidos para vacas con un umbral de 500.000 células/ml (LERONDELLE y POUTREL, 1984). Sin embargo, en el periodo de secado, aunque el 90 p. 100 de las infecciones por patógenos mayores fueron diagnosticadas, aproximadamente un 60 p. 100 de ubres no infectadas fueron consideradas como infectadas, debido a que en este periodo los contajes celulares son muy elevados (LERONDELLE y POUTREL, 1984).

J. L. LINZELL y PEAKER (1972), T. NESBAKKEN (1978) observaron variaciones en los contajes celulares de tal forma que una glándula mamaria infectada desvía el contaje de la otra glándula contigua no infectada. Esto podría indicar un efecto local, debido fundamentalmente a la infección.

Este factor se ha considerado ser importante en el diagnóstico de las mastitis caprinas (LINZELL y PEAKER, 1972; NESBAKKEN, 1978; LERONDELLE y POUTREL, 1984). Es por ello, que se ha considerado que

un conteo de células somáticas superior o igual a 1.000.000 de células/ml y las diferencias en los conteos celulares de muestras de leche de dos mitades mamarias fueran probablemente el criterio de selección en los laboratorios de diagnóstico de mastitis en el ganado caprino (THORNTON, 1983; LERONDELLE y POUTREL, 1984).

Debido a la gran confusión que existe en la literatura con respecto a los conteos celulares en el ganado caprino, es por lo que se ha indicado la necesidad de realizar más estudios que puedan definir todos estos factores más claramente pero (SMITH y ROGUINSKY, 1977; NESBAKKEN, 1978; MANSER, 1985), al igual que ocurre en el vacuno, los conteos de células somáticas probablemente son de escaso valor cuando se llevan a cabo sobre un determinado animal y no colectivamente (MANSER, 1985).

Su mayor valor está en las determinaciones seriadas en un mismo rebaño que muestran los cambios en la incidencia de mastitis subclínica (POUTREL y LERONDELLE, 1984; MANSER, 1985).

3.2.2.4.- Método Fossomatic

En este método las células somáticas son partículas que tienen una intensidad mínima de fluorescencia debido a la tinción del DNA nuclear con colorantes fluorescentes (CASADO y BLANCO, 1978).

Para ello, 0'2 mililitros de cada muestra de leche se mezcla con una solución tampón y solución colorante. Parte de esta mezcla es transferida después en forma de una película delgada a un disco rotativo que sirve como un objeto plano para el microscopio. Cada célula produce un impulso eléctrico que es ampliado y registrado (CASADO y BLANCO, 1978).

Las partículas citoplásmicas parecidas a las células que no son leucocitos y que comúnmente se encuentran en la leche de cabra no contienen ADN, es por ello, que los métodos específicos para medir el ADN dan resultados significativamente menores que los conteos electrónicos de partículas mediante *Coulter-Counter* o con los conteos de células somáticas con métodos directos al microscopio mediante técnicas de tinciones no específicas (DULIN y cols., 1982; DULIN y cols., 1983; KALOGRIDOU-VASSILIADOU y cols.,

1992).

Algunos autores recomiendan usar únicamente para la estimación del conteo de células somáticas en la leche de cabra métodos específicos para la determinación del ADN celular (DULIN y cols., 1983; MAISI, 1990a).

Las medias de conteos celulares de muestras de leche de cabras con ubres libres de infección se han encontrado entre 270.000 células/ml (KALOGRIDOU-VASSILIADOU, 1992) y 480.000 células/ml (POUTREL y LERONDELLE, 1983; PERNTHANER y cols., 1991).

Estos resultados son bastantes menores que las medias de conteos celulares realizados por aquellos autores que emplearon un *Coulter-Counter* (OKADA, 1960; NESBAKKEN, 1976; PEREZ y SCHULTZ, 1979; PETERSEN, 1981; POUTREL y LERONDELLE, 1983).

Los conteos celulares con *Fossomatic* en ubres que albergan patógenos menores, al igual que se observa con el *Coulter* son mayores que los de las ubres libres de infección (ROGUINSKY y cols., 1971; HOLMBERG, 1973; SMITH y ROGUINSKY, 1977; DULIN y cols., 1982; POUTREL y LERONDELLE, 1983; KALOGRIDOU-VASSILIADOU, 1992).

Cuando los conteos con el método *Fossomatic* se exceden de 1.000.000 de células por mililitro se ha observado que detecta entre un 72-80% de infecciones con patógenos mayores (POUTREL y LERONDELLE, 1983; KALOGRIDOU-VASSILIADOU, 1992), siendo la detección de patógenos menores más pequeña, entre 18 y 45% (POUTREL y LERONDELLE, 1983; KALOGRIDOU-VASSILIADOU, 1992).

D. SIERRA y cols. (1992) recogen que el umbral de 500.000 células por mililitro reúne los mayores porcentajes de sensibilidad y especificidad para el diagnóstico de las mastitis subclínicas en el ganado caprino.

Al igual que ocurre con el método *Coulter*, los conteos realizados con el *Fossomatic* se observan con niveles más elevados hacia el final de la lactación (KALOGRIDOU-VASSILIADOU, 1992).

M. PEREZ y SCHULTZ (1979) sugirieron que los conteos celulares debían relacionarse con el estado de la lactación, y que hacia el final de la

lactación podían alcanzar valores similares a los de las ubres infectadas con patógenos mayores.

En cuanto a los incrementos en las etapas iniciales e intermedias de la lactación no se han presentado homogéneas entre los diversos estudios. Algunos autores observan incrementos celulares entre el segundo y cuarto mes de lactación (HINCKLEY y WILLIAMS, 1981; KALOGRIDOU-VASSILIADOU, 1992), otros sin embargo, encuentran las mayores concentraciones de los contajes celulares durante la primera semana de lactación, reduciéndose durante los estadíos intermedios e incrementándose otra vez hacia el final de la lactación (CULLEN, 1968; SHELDRAKE y cols., 1981).

Los diversos autores que han comparado los resultados de los contajes de células somáticas obtenidos con ambos métodos electrónicos *Coulter-Counter* y *Fossomatic* han observado que existe una correlación positiva significativa entre ambas técnicas (entre $r=0'74$ y $R=0'79$) en el ganado caprino (ROGUINSKY y cols., 1981; POUTREL y cols., 1983).

3.3.- MEDICION DE LA RESPUESTA INMUNE EN LA UBRE DE LOS RUMIANTES.

3.3.1.- INMUNIDAD HUMORAL

La función inmunológica de las secreciones mamarias está relacionada tanto con el suministro de protección a las crías como con la protección de la propia glándula mamaria contra los patógenos de la ubre (GUIDRY y cols., 1980; OLSON y cols., 1981; CAFFIN y POUTREL, 1988; CULLOR y cols., 1991; BENDA, 1993).

La concentración de inmunoglobulinas en la leche parecen ser insuficientes para esta última función (NORCROSS y STARK, 1970; NORCROSS, 1977; CAFFIN y POUTREL, 1988). Es por ello que diversos estudios se han dirigido para incrementar las defensas mamarias (NORCROSS, 1977; CRAVEN y WILLIAMS, 1985).

REVISION BIBLIOGRAFICA

Alteraciones en la cantidad y especificidad de las inmunoglobulinas maternas pueden tener serias consecuencias para la salud de los animales jóvenes (CIUPERCESCU, 1977; OLSON y cols., 1981).

Factores que pueden producir variaciones en la concentración de inmunoglobulinas en el plasma o en los calostros incluyen la edad (WILLIAMS y cols., 1975; WILLIAMS y MILLAR, 1979; DEVERY-POCIUS y LARSON, 1983), la raza (HALLIDAY y cols., 1978; WILLIAMS y MILLAR, 1979), la dieta (WILLIAMS y MILLAR, 1979; OLSON y cols., 1981) y el estado fisiológico de la lactación (CIUPERCESCU, 1977; CAFFIN y cols., 1983; CAFFIN y POUTREL, 1988).

La secreción de los calostros y la lactogénesis se producen debido a un preciso equilibrio endocrino que tiene lugar durante la gestación y la lactación (SMITH y cols., 1972; CULLOR y cols., 1990). La secreción de los calostros tiene lugar próximo al parto, coincidiendo con un rápido declive de los niveles plasmáticos de progesterona, y un incremento del estrógeno plasmático hacia los niveles más elevados que se observan durante la gestación (CULLOR y cols., 1990).

Durante aproximadamente el último mes de gestación, los fluidos comienzan a acumularse en la glándula mamaria (DELOUIS, 1978; GUIDRY y cols., 1980; OLSON y cols., 1989; TUCKER, 1981; CULLOR y cols., 1990). En la cabra esta secreción láctea tiene un mayor contenido de Na, Cl y proteína y una mayor concentración de K y lactosa que los observados en la leche (PEAKER y LINZELL, 1973; CULLOR y cols., 1990).

En los rumiantes no se produce transferencia transplacentar de inmunoglobulinas hacia el feto. Toda transferencia de inmunoglobulinas a las crías es pasiva y tiene lugar inmediatamente tras el parto (BUTLER, 1974; GUIDRY y cols., 1980). Es por ello que la composición de inmunoglobulinas en las secreciones lácteas de los rumiantes es muy elevada durante este periodo (BUTLER, 1974; GUIDRY y cols., 1980; GUIDRY y MILLER, 1986).

Las inmunoglobulinas representan la clase más importante de proteínas en la leche (CULLOR y cols., 1990). Existe una inmensa variación en la concentración de inmunoglobulinas en los fluidos lácteos de las secreciones de las glándulas no lactantes y los calostros, y a través de los

REVISION BIBLIOGRAFICA

diversos estados de la lactación (NORCROSS, 1977; CAFFIN y POUTREL, 1988; CULLOR y cols., 1990).

La concentración de las inmunoglobulinas en la leche es baja (0'5-1'4 mg/ml) comparada con los calostros (50 mg/ml). Esto representa aproximadamente el cinco por ciento de las proteínas séricas normales durante la lactación (JANOTA-BASSALIK y cols., 1975; NORCROSS, 1977).

Rápidamente se producen cambios durante la primera semana postparto, ya que se ha observado que las inmunoglobulinas G₁, G₂, A y M disminuyen rápidamente durante el periodo posparto (primeros cinco días de lactación) (BUTLER, 1974; GUIDRY y cols., 1980; GUIDRY y MILLER, 1986).

Considerando las diversas clases de inmunoglobulinas, existe un proceso selectivo el cual es efectivo en favor del transporte del sistema humoral de una subclase de inmunoglobulina (IgG₁) sobre las otras (IgG₂, IgM, IgA) (SMITH y cols., 1972; WATSON y cols., 1972; NORCROSS, 1977; CAFFIN y POUTREL, 1988; CULLOR y cols., 1990).

Resultando pues, que la principal inmunoglobulina secretada de la glándula mamaria del vacuno y posiblemente de todos los rumiantes es la IgG₁ (GUIDRY y cols., 1980; CAFFIN y cols., 1983; GUIDRY y MILLER, 1986). La acción notable de este proceso selectivo resulta con calostros enormemente ricos en IgG₁, una clase de inmunoglobulina que tiene funciones protectoras importantes contra enfermedades infecciosas (GUIDRY y cols., 1980; CAFFIN y cols., 1983; GUIDRY y MILLER, 1986).

Los niveles de IgG₁ disminuyen en el plasma materno de dos a tres semanas antes del parto, siendo durante este periodo donde se observan las concentraciones máximas de IgG₁ (BRANDON y cols., 1971; GUIDRY y cols., 1980; CULLOR y cols., 1990). Mayores niveles de IgG₁ en calostro que en el suero corresponden al mencionado mecanismo de transferencia selectiva que comienza a activarse de dos a tres semanas antes del parto (BRANDON y cols., 1971; GUIDRY y cols., 1980; CULLOR y cols., 1990), siendo esta transferencia selectiva bastante menor durante la lactación (CIUPERCESCU, 1977).

REVISION BIBLIOGRAFICA

Aunque existen numerosos estudios acerca de las concentraciones relativas de inmunoglobulinas en la sangre y secreciones mamarias de los rumiantes (BRANDON y cols., 1971; PORTER, 1972; WATSON y cols., 1972; WILSON y cols., 1972; ZIV y GORDON, 1973; BRANDON y LASCELLES, 1975), estos estudios se han centrado fundamentalmente en la caracterización de la dinámica de concentración durante la formación de los calostros y al inicio de la lactación en relación a la protección de las crías, pero han sido pocos los estudios que se han llevado a cabo relativos al contenido de inmunoglobulinas en la leche a lo largo del ciclo de la lactación (GUIDRY y cols., 1980; CAFFIN y cols., 1983; CAFFIN y POUTREL, 1988).

En el estudio llevado a cabo por A. J. GUIDRY y cols. (1980), se comprobó que las concentraciones de inmunoglobulinas van descendiendo hasta sus niveles más bajos tras los treinta días del parto, observándose luego un incremento hacia el final de la lactación. Tal fenómeno podría deberse a la constante producción del nivel de inmunoglobulinas mientras se produce una disminución de leche (GUIDRY y cols., 1980; CAFFIN y cols., 1983).

En el estudio llevado a cabo sobre la dinámica de las concentraciones de inmunoglobulinas a lo largo de la lactación, A. J. GUIDRY y cols. (1980) aislaron en una ocasión de un caso clínico de mastitis *Escherichia coli*, no observando ninguna afectación a las inmunoglobulinas de la leche.

Sin embargo, la penetración de bacterias en el interior de la glándula mamaria induce una reacción inflamatoria que produce una modificación de la leche (ASHWORTH y cols., 1967; FOX y cols., 1981; CAFFIN y cols., 1983). Es por ello importante determinar las variaciones fisiológicas normales de los componentes en relación a la infección mamaria (CAFFIN y cols., 1983; GUIDRY y MILLER, 1986).

En el estudio realizado por J. P. CAFFIN y cols. (1983), las concentraciones de IgG₁ en bovinos con ubres libres de infecciones fueron similares al principio (treinta días) y a mitad de la lactación (150 días), pero se presentaron significativamente mayores al final de este periodo (270 días).

En diversos estudios se ha observado que durante las primeras tres lactaciones no se afecta la concentración de IgG₁ en la leche. Pero después de la tercera lactación, las concentraciones de IgG₁ se incrementan

significativamente con grandes variaciones individuales (KLOBASA y cols., 1977; CAFFIN y cols., 1983).

En cuanto al estado de infección, se ha observado que los *Staphylococcus aureus* producen incrementos de IgG₁ en esas mamas infectadas, incrementos que se ha sugerido pueden ser debidos al proceso inflamatorio (CAFFIN y cols., 1983). Y aquellas mamas que albergaban patógenos menores mostraban menos incrementos de IgG₁ (CAFFIN y cols., 1983). Sin embargo, en este estudio no observaron modificaciones de las concentraciones de IgG₁ en mamas infectadas por estreptococos (CAFFIN y cols., 1983).

J. P. CAFFIN y cols. (1983) determinaron el contaje de células somáticas para predecir la probabilidad de infección en los cuarterones, y al compararlos con los niveles de IgG₁ en la leche no observaron correlación entre ambos parámetros en cuarterones libres de infección. Este coeficiente de correlación no se modificaba significativamente por patógenos menores y estreptococos pero se incrementaba por la presencia de *Staphylococcus aureus* (CAFFIN y cols., 1983).

Sin embargo, en el estudio realizado por A. J. GUIDRY y MILLER (1986) se obtiene que los cuarterones con contajes celulares por encima de 1×10^6 células por mililitro tenían mayores concentraciones de IgG₁ y de IgG₂, pero no observaron diferencias cuando utilizaban como dintel 400.000 células por mililitro.

En este estudio no se ha observado diferencias significativas entre las concentraciones de los distintos isotipos de inmunoglobulinas debidos a grupos genéticos, sugiriendo que la producción de leche no tiene efectos significativos sobre la concentración de inmunoglobulinas en la leche (GUIDRY y MILLER, 1986). Igualmente observaron que todos los isotipos de inmunoglobulinas iban disminuyendo a lo largo de la lactación hasta los cinco meses y a partir de aquí se observa un ascenso hacia el octavo mes.

Las inmunoglobulinas IgG₂, a pesar de su relativa baja concentración, parecen ser funcionalmente muy importantes (CAFFIN y POUTREL, 1988). Estos niveles de IgG₂ en la leche son el resultado de diferentes mecanismos, entre los que se encuentran transporte pasivo desde el suero (BRANDON y cols., 1971; GUIDRY y cols., 1980; CAFFIN y POUTREL, 1988), transporte

REVISION BIBLIOGRAFICA

selectivo desde el suero (WATSON, 1980; CAFFIN y POUTREL, 1988), síntesis local (LISOWSKI y cols., 1975; NEWBY y BOURNE, 1977; CAFFIN y POUTREL, 1988) y por unión a los polimorfonucleares (WATSON y LASCELLES, 1973; CAFFIN y POUTREL, 1988).

La relativa importancia de esos modos de entrada de IgG₂ hacia la leche es probablemente dependiente de la naturaleza y la intensidad de los factores estimulantes, edad, estado de lactación, número de lactaciones, agente infeccioso y productos inflamatorios (MATHISON y cols., 1984; CAFFIN y POUTREL, 1988).

Se ha asumido que las IgG₂ son la principal opsonina (WATSON, 1976; HILL y cols., 1983; GUIDRY y MILLER, 1985; CAFFIN y POUTREL, 1988) y son citofílicas para los neutrófilos polimorfonucleares y macrófagos (WATSON y LASCELLES, 1973; GUIDRY y MILLER, 1985). Son considerablemente más citofílicas que las IgG₁ y realizan la fagocitosis (WATSON, 1976; OPDEBEECK, 1982; CAFFIN y POUTREL, 1988) y además tienen actividad bactericida contra microorganismos tales como los *Staphylococcus aureus* (WATSON, 1976; LASCELLES, 1979; GUIDRY y cols., 1980; MATHISON y cols., 1984).

Es por ello que la deficiencia selectiva de IgG₂ se asocia con infecciones, tales como las mastitis (NANSEN, 1972; MAZENGERA y cols., 1985; CAFFIN y POUTREL, 1988).

La fagocitosis de los patógenos invasores es el principal mecanismo de defensa para prevenir el establecimiento de infecciones intramamarias (CULLOR y cols., 1990), y se ha sugerido que las IgG₁ es la defensa más importante de la glándula mamaria en los primeros estadios de la infección y la importancia de las IgG₂ se incrementa al entrar los polimorfonucleares en la glándula durante la inflamación (SELSTED y cols., 1981; NICKERSON y cols., 1985; CULLOR y cols., 1990).

Las inmunoglobulinas M también se transportan pero en menor concentración desde el suero a los calostros (OLSON y cols., 1981). Los cambios de la concentración de IgM sérica durante la lactación siguen esencialmente el mismo patrón que las IgG₁, por lo que la transferencia de esta clase de inmunoglobulina hacia la leche también continúan a lo largo del periodo de la lactación (CIUPERCESCU, 1977; OLSON y cols., 1981).

Las inmunoglobulinas A en la glándula mamaria pueden funcionar de diversas maneras: (1) neutralización de toxinas bacterianas (NORCROSS, 1977; LARSON, 1985; GUIDRY y MILLER, 1986), (2) aglutinación de bacterias, y por tanto facilitando su eliminación durante el ordeño (LARSON, 1985; GUIDRY y MILLER, 1986; CULLOR y cols., 1990), (3) previniendo la multiplicación de bacterias (NORCROSS, 1977; LARSON, 1985; GUIDRY y MILLER, 1986; CULLOR y cols., 1990) y (4) previniendo la adherencia de bacterias a las superficies de los epitelios (NORCROSS, 1977; LARSON, 1985; GUIDRY y MILLER, 1986; CULLOR y cols., 1990).

3.3.1.1.- Técnica de inmunodifusión radial

La inmunoprecipitación en geles es la base de un número de importantes técnicas aplicadas ampliamente en el estudio de anticuerpos y para la detección y medición de antígenos solubles (CATTY y RAYKUNDALIA, 1988). Esto se basa en el principio de que al llevar una fase acuosa los geles, la mayoría de las macromoléculas (de peso molecular mayor de 10^6) pueden difundirse en los mismos libremente (CATTY y RAYKUNDALIA, 1988).

La inmunodifusión radial es el método más ampliamente empleado para cuantificar seroinmunoglobulinas (y otras seroproteínas), y es el que se acepta para la estandarización de sueros de referencia. Por consiguiente, es también el método con el cual se comparan los otros (JACKSON y DAVIS, 1984).

La técnica de inmunodifusión radial tiene diversas aplicaciones entre las que se encuentran:

(1) Cuantificación individual de inmunoglobulinas

Los métodos cuantitativos para la determinación de componentes de inmunoglobulinas individuales son herramientas importantes en los estudios inmunológicos (CATTY y RAYKUNDALIA, 1988).

REVISION BIBLIOGRAFICA

Esta técnica se ha empleado en la cuantificación tanto de las inmunoglobulinas séricas (LOGAN y cols., 1972; SMITH y cols., 1975; WILLIAMS y cols., 1975; CIUPERCESCU, 1977; GUIDRY y cols., 1980), como para la cuantificación de inmunoglobulinas en fluidos corporales (SMITH y cols., 1975), y en la determinación de los niveles de inmunoglobulinas presentes en la leche y los calostros (SMITH y cols., 1975; OLSON y cols., 1981; CAFFIN y POUTREL, 1988).

La media de la concentración de IgG₁ en la especie bovina determinados mediante inmunodifusión radial han mostrado unos valores medios en ubres libres de infección de: a los 30 días: $0'38 \pm 0'11$ mg/ml, en las etapas intermedias de la lactación (150 días) $0'37 \pm 0'145$ mg/ml, y se han mostrado significativamente más elevados al final de este periodo (270 días) $0'60 \pm 0'33$ mg/ml (CAFFIN y cols., 1983). En general las concentraciones de todas las inmunoglobulinas se incrementan durante la etapa terminal de la lactación, coincidiendo con una mayor reducción de la producción de leche (GUIDRY y cols., 1980).

Desde el momento del postparto se produce una rápida disminución en la leche de las concentraciones de IgG₁ (GUIDRY y cols., 1980), que presentan una correlación negativa con el aumento de IgG₁ en el suero. Esta correlación muestra la presencia de un transporte selectivo de IgG₁ desde el suero hacia la leche (DIXON y cols., 1961; GUIDRY y cols., 1980).

La media de la concentración de IgG₂, determinado con esta técnica en la leche bovina se ha mostrado con unos niveles superiores al principio (30 días: $17'95 \pm 9'45$ µg/ml) que en mitad de la lactación (150 días: $14'81 \pm 7'38$ µg/ml) (CAFFIN y POTREL, 1988), probablemente debido a que a los 30 días el transporte activo de IgG₂, particularmente importante durante el periodo de formación de los calostros, no se haya abolido completamente (WATSON 1980; CAFFIN y POUTREL, 1988).

La media de concentración de IgG₂ en la leche al final del periodo de la lactación (270 días) se ha mostrado en bovinos significativamente mayor que en la etapa media de la lactación (BUTLER, 1983; MALLARD y cols., 1983; MAZENGERA y cols., 1985; CAFFIN y POUTREL, 1988). Incrementos que también han sido observados con el estado de lactación para el conteo de células somáticas (BODOH y cols., 1976; CAFFIN y POUTREL, 1988), la albúmina sérica bovina (GISECKE y VILJÖEN, 1974;

REVISION BIBLIOGRAFICA

POUTREL y cols., 1983), IgG₁ (GUIDRY y cols., 1980; CAFFIN y cols., 1983) y β -lactoglobulina (CAFFIN y cols., 1985).

Este incremento de la concentración de IgG₂ podría explicarse por el incremento del contaje de células somáticas. Pues la IgG₂ puede pasar selectivamente hacia la leche sobre los polimorfonucleares (WATSON y LASCELLES, 1973; BUTLER, 1983; GUIDRY y MILLER, 1985; CAFFIN y POUTREL, 1988) o bien su concentración se incrementa debido a una disminución de la producción de la leche en conjunto con un pequeño transporte activo (MACKENXIE y LASCELLES, 1968; CAFFIN y POUTREL, 1988) o producción local (NEWBY y BOURNE, 1977; CAFFIN y POUTREL, 1988).

En cuanto a las influencias según el estado de infección de las ubres bovinas, se ha observado que los estafilococos coagulasa-negativos no influyen en el contenido de IgG₂ en la leche ($19'20 \pm 8'58 \mu\text{g/ml}$) o en el suero ($11'44 \pm 2'73 \text{ mg/ml}$) (CAFFIN y POUTREL, 1988).

Con la presencia de *Corynebacterium bovis* en un cuarterón, se ha observado que la concentración de IgG₂ en la leche se incrementaba ($26'79 \pm 11'64 \mu\text{g/ml}$) excepto en mitad de la lactación (150 días: $17'90 \pm 7'60 \mu\text{g/ml}$) (CAFFIN y POUTREL, 1988).

Las concentraciones de IgG₁ y de IgG₂ aunque se incrementan en la leche en presencia de *Corynebacterium bovis*, lo hacen de distinta manera según el estado de lactación (CAFFIN y POUTREL, 1988); mientras que el porcentaje de incremento para la IgG₁ es casi constante a lo largo de la lactación, sin embargo los porcentajes de incremento para la IgG₂ se muestran más variables (CAFFIN y POUTREL, 1988). Estos resultados se correlacionan parcialmente con la síntesis local de IgG₂ estimulados por la infección (LISTER, 1972; LISOWSKI y cols., 1975; NEWBY y BOURNE, 1977; CAFFIN y POUTREL, 1988).

En contraste al contenido de IgG₁ (CAFFIN y cols., 1983), el contenido de IgG₂ en la leche ($29'53 \pm 12'66 \mu\text{g/ml}$) se incrementa significativamente en cuarterones que albergan estreptococos (CAFFIN y POUTREL, 1988). Sin embargo el contenido de IgG₂ en el suero no se influencia por la infección de estreptococos, lo cual apoya la idea de que se produce alguna síntesis local (CAFFIN y POUTREL, 1988).

REVISION BIBLIOGRAFICA

En cuarterones que albergan *Staphylococcus aureus*, se incrementan las concentraciones de IgG₂ en la leche ($37'46 \pm 16'98 \mu\text{g/ml}$) y en el suero ($15'58 \pm 3'73 \text{ mg/ml}$), particularmente a mitad de la lactación (CAFFIN y POUTREL, 1988). Siendo estos incrementos particularmente importantes en animales mayores, los cuales son los que se infectan más frecuentemente (CAFFIN y POUTREL, 1988).

Estos incrementos de IgG₂ al mostrarse menores que el incremento del conteo de células somáticas apoya la idea de que en los cuarterones infectados con *Staphylococcus aureus*, la transferencia pasiva de IgG₂ hacia la leche no es un mecanismo predominante (CAFFIN y POUTREL, 1988).

En el gando ovino la concentración de IgG medida por inmunodifusión radial ha mostrado unos valores medios en miligramos por 100 mililitros en la leche de $88'80 (47-175) \pm 10$ y en los calostros de $10.121 (5.000-16.400) \pm 724$ (WATSON y LASCELLES, 1973; SMITH y cols., 1975).

(2) Diagnóstico de las mastitis subclínicas

Con esta finalidad se ha utilizado la técnica en varias ocasiones (HILPERT y ENKELMAN, 1964; GIESECKE y cols., 1973; GIESECKE y VAN DEN HEEVER, 1974; VILJOEN, 1974;).

H. HILPERT y ENKELMAN (1964) examinaron muestras de leche por inmunodifusión radial utilizando un antisuero polivalente producido frente a células de leche mastíticas, describiendo un método para el diagnóstico de mastitis ya que observaron una buena correlación entre el tamaño de los anillos de precipitación y el conteo celular.

W. H. GIESECKE y cols. (1973) sugirieron la purificación del antígeno que es responsable del desarrollo del principal anillo de precipitación y con la preparación de un antisuero específico para el antígeno se mejoraba la especificidad y se facilitaba la estandarización del test.

Basándose en estos estudios se han llevado a cabo diversas aplicaciones en el campo del diagnóstico de las mastitis (GIESECKE y VAN DEN HEEVER, 1974; VILJOEN, 1974; MALHOTRA y KAPUR, 1983; DAHIYA

y KAPUR, 1988).

3.3.2.- INMUNIDAD CELULAR

La respuesta inmune mediada por células está bastante menos aclarada que la respuesta inmune humoral (NORCROSS, 1977; CULLOR y cols., 1990). La escasa información obtenida acerca de la inmunidad celular se ha conseguido con la aplicación de técnicas tales como marcadores de superficies celulares y citometría fluorométrica (NORCROSS, 1977; CULLOR y cols., 1990).

La población de linfocitos en sangre periférica bovina consiste en un 73 por ciento de linfocitos T y un 27 por ciento del tipo B (NORCROSS, 1977; CULLOR y cols., 1990). En la leche los linfocitos T pueden representar entre el 31 al 65 p. 100 de la población, mientras que el porcentaje de linfocitos B son aproximadamente del 22 al 42 p. 100 (NORCROSS, 1977; CULLOR y cols., 1990).

Después de recoger linfocitos de cuaterones infectados con *Staphylococcus aureus* se ha demostrado *in vitro* que la blastogénesis linfocítica está marcadamente deprimida durante la infección (NONNECKE y HARP, 1985). Esto sugiere que la función linfocítica *in vivo* está comprometida, lo cual probablemente contribuye a la cronicidad de las mastitis estafilocócicas (NONNECKE y HARP, 1985; CULLOR y cols., 1990).

El resultado de estas observaciones ha sugerido que sea bastante probable que la respuesta inmune mediada por células tenga influencia sobre los mecanismos defensivos de la glándula mamaria (NONNECKE y HARP, 1985; CULLOR y cols., 1990).

III.- MATERIAL Y METODOS

III.1.- PROTOCOLO DE TRABAJO

El presente trabajo lo hemos desarrollado con dos experiencias bien diferenciadas.

En la primera de ellas hemos pretendido establecer los valores celulares normales y patológicos presentes en la leche de la Agrupación Caprina Canaria considerando factores que pueden influir en los mismos tales como la edad y estadio de la lactación de cada animal estudiado. Para ello hemos utilizado una prueba cualitativa (*California Mastitis Test*) y dos cuantitativas (métodos *Coulter-Counter* y *Fossomatic*).

La segunda fase la hemos planteado en aras de establecer los valores de IgG en suero lácteo tanto en animales sanos como en animales que padecían mastitis subclínicas diagnosticadas mediante las técnicas convencionales utilizadas en la primera fase del trabajo, intentando separar en estos últimos los valores que correspondían a las diferentes etiologías implicadas en cada caso, y todo ello durante una lactación completa (para los animales sanos), o desde la detección de la mastitis hasta el final de la lactación (para los animales con mastitis subclínica). Esta cuantificación en suero lácteo se ha determinado mediante la técnica de inmunodifusión radial como método alternativo del control de las mastitis subclínicas en la especie caprina.

La primera fase se llevó a cabo en una explotación situada en el término municipal de Gáldar de la isla de Gran Canaria con un censo de 120 animales, con un clima de tipo seco, y una temperatura media anual superior a los 18°C. Este rebaño fue seleccionado por un triple motivo: presentar una moderada incidencia de mastitis, disponer de facilidades tanto directivas como infraestructurales para la ejecución del proyecto y responder al modelo de explotación habitual del ganado caprino en el Archipiélago Canario.

Las características de esta explotación es de tipo semiintensivo constituida por tres zonas bien diferenciadas, una zona de corrales cubiertas donde se encuentran los comederos y bebederos del ganado caprino y donde duermen los mismos. Otra área de la explotación está formada por un

MATERIAL Y METODOS

espacio abierto lindado en el cual se mueven los animales durante el día. Y la tercera zona está constituida por la sala de ordeño automático, en la cual se ordeñan diariamente a los animales una vez al día.

Las medidas higiénicas llevadas a cabo durante el ordeño son escasas, limitadas a la desinfección de las ubres antes y después del ordeño de forma irregular dependiendo de la mano de obra de la ganadería.

Las edades comprendidas de los animales de esta explotación van desde animales recién nacidos hasta nueve años, de los cuales seleccionamos aquellos grupos que se ordeñaban con regularidad y, estando identificados nos permitían su seguimiento a lo largo de la lactación, comprendiendo un grupo de tres y otro de cuatro años con dieciocho animales cada uno, el grupo de seis y siete años lo forman un total de treintaitrés cabezas y el de ocho y nueve años constituido por dieciséis animales.

En las muestras recogidas durante esta fase se llevaron a cabo los siguientes estudios:

- (1) Cultivos bacteriológicos de las muestras de leche con el fin de aislar e identificar los diversos tipos de microorganismos productores de mastitis subclínica.
- (2) *California Mastitis Test* como método indirecto para la identificación de mastitis subclínicas ya que es un reflejo del número aproximado de leucocitos presentes en las muestras de leche.
- (3) Contaje celular con *Fossomatic* para establecer los valores normales en el ganado caprino estudiado.
- (4) Contaje celular con *Coulter-Counter* como método comparativo con las demás técnicas y valorar su posible aplicación en el ganado caprino.

Para la segunda fase experimental hemos seleccionado una granja ubicada en el término municipal de Las Palmas (Tafira), con un censo aproximado de 400 animales. El clima de esta zona es de tipo templado con temperaturas invernales inferiores a los 18°C.

MATERIAL Y METODOS

La elección se ha realizado en base a que debido al elevado número de partos que tienen lugar en una época del año se podía seleccionar un lote de animales recién paridos en días próximos, y de este modo controlarlos paralelamente de una manera continua. Al igual que en la granja de la fase anterior nos ha motivado las facilidades directivas e infraestructurales para la realización de la misma, además de adecuarse también a las condiciones generales de explotación del ganado caprino en Canarias.

Siendo pues la explotación de tipo semiintensivo, constituida al igual que la granja anterior por tres zonas bien diferenciadas, una de ellas correspondiente al área de comederos y bebederos, la cual se encuentra cubierta y es donde duermen los animales, otra zona constituida por un espacio libre lindado por donde se desenvuelven los animales diariamente tras el ordeño, realizándose éste de forma automática en el área correspondiente al mismo.

En esta fase experimental hemos seleccionado dos lotes de animales. El primero constituido por 8 cabras recién paridas, consideradas con mamas clínicamente sanas, en las que se confirma el estado sano de las glándulas mamarias por presentar menos de 5 unidades formadoras de colonias/10 μ l de leche a la realización de cultivos bacteriológicos (MANSER, 1986).

En este grupo de los animales sanos se hicieron controles diarios en la primera semana postparto, seguido de controles a los 10, 14 y 20 días, y luego mensualmente a lo largo de la lactación, durante 6 meses.

El segundo lote lo forman un grupo de 12 animales con presentación de mastitis subclínica, que fue demostrado por presentar crecimiento de bacterias a la realización de cultivos bacteriológicos (más de 5 colonias/10 μ l, (MANSER, 1986), determinados en cada muestreo. En este grupo se les realizó controles mensualmente durante 6 meses a lo largo de la lactación.

Los estudios que se llevaron a cabo en estos dos lotes de animales fueron:

- (1) Cuantificación de IgG presentes en la mama con la técnica de Inmunodifusión radial (RID), para elaborar la evolución de la concentración de IgG en leche de cabras libres de infección en la

MATERIAL Y METODOS

ubre a lo largo de la lactación.

- (2) Cultivos bacteriológicos e identificación de los microorganismos aislados para ver las modificaciones de los niveles de IgG frente a cada agente causal.
- (3) *California Mastitis Test* para comprobar si las variaciones de las concentraciones de IgG tienen relación con las variaciones mostradas con este método.
- (4) Contajes celulares con las técnicas de *Fossomatic* y *Coulter-Counter* para valorar con estos métodos cuantitativos las posibles variaciones en relación a los niveles de IgG en la leche.

III.2.- METODOS DE LABORATORIO

2.1.- RECOGIDA DE MUESTRAS

Se han realizado poniendo atención en condiciones de asepsia, pues las muestras contaminadas durante la toma son inservibles.

Posee considerable importancia la técnica del aseo del pezón. Para ello, se limpiaron las ubres con toallas de un solo uso que contienen una combinación de desinfectante, con propiedades reepitelizantes¹. Y una vez eliminados los primeros chorros de leche, se procedió a la recolección de las muestras (50 ml.), procedente de cada mama individual, en recipientes estériles e identificados para cada animal.

Inmediatamente fueron refrigeradas y transportadas en neveras portátiles al laboratorio para la realización de los diversos métodos de estudios a aplicar, y que explicamos a continuación.

De los 50 ml de leche recogidos de cada glándula mamaria se repartieron del siguiente modo: 3-4 ml para el método indirecto *California Mastitis Test*, 10 ml para la realización de contajes celulares con *Fossomatic*, 10 ml para la aplicación de la técnica de *Coulter-Counter*, 10 ml de leche los cuales se centrifugaron para obtener el sobrenadante que se utilizó en la técnica de inmunodifusión radial, y de la leche sobrante se realizaron los cultivos en ágar sangre y medios específicos para micoplasmas.

2.2.- CULTIVO BACTERIOLOGICO DE LA LECHE

De cada muestra se sembró con un asa de siembra (0'01 ml) en ágar sangre que se incubó durante un periodo de 24 horas a 37°C en aerobiosis,

¹ Laboratorios Dr. Esteve

MATERIAL Y METODOS

al cabo de las cuales se examinaron en busca de colonias bacterianas.

Además de la utilización de ágar sangre para los aislamientos bacterianos, se utilizaron medios específicos -Hayflick modificado- para el aislamiento de micoplasmas, los cuales no se aíslan en los medios habituales.

Se consideró que las ubres presentaban infección cuando en el ágar sangre crecían 5 o más unidades formadoras de colonias por 0'01 ml. de las muestras de leche (MANSER, 1986). Y en los medios de Hayflick modificado cuando crecían micoplasmas.

Tras la incubación se recogieron colonias, por medio de un asa bacteriológica y se realizaron frotis con la aplicación de la tinción de Gram para ayudar a su identificación.

Una vez identificados los microorganismos morfológicamente, se realizaron pruebas complementarias para llevar a cabo la clasificación taxonómica de acuerdo con el Manual Bergey de Bacteriología Sistemática (KRIEG y HOLT, 1983; SNEATH y col., 1984; STALEY y col., 1984; WILLIAMS y col., 1984), entre las que se encuentran:

a) Reacción de la catalasa

La reacción se realizó llevando una pequeña cantidad del cultivo del medio sólido, de preferencia una colonia aislada, a un portaobjetos. Se añadió una gota de peróxido de hidrógeno (riqueza 3%), ayudando a que se mezclara con un asa de siembra.

La reacción positiva se manifiesta por la producción de burbujas de gas.

b) Prueba de la coagulasa

La producción de coagulasa por los estafilococos se considera un criterio importante de potencialidad patógena.

Para la realización de esta prueba hemos empleado el reactivo

MATERIAL Y METODOS

comercial "Staphilase Test"², del cual se mezcla una gota del mismo con colonias recogidas con un asa bacteriológica. La aparición de grumos por coagulación en 5 segundos indica una reacción positiva.

2.2.1.- MEDIOS DE CULTIVOS

2.2.1.1. Agar sangre

Hemos empleado como medio base el "Blood Agar Base"³, que tiene la siguiente composición:

Extracto de carne	500 g
Triptosa	10 g
Cloruro sódico	5 g
Agar	15 g

Suspender 40 g. en 1000 ml de agua destilada y calentar hasta disolver completamente. Se esteriliza en autoclave a 120°C, durante 15 minutos.

Se añade asépticamente sangre de oveja desfibrinada estéril al 7%.

El medio así preparado se vierte en placas de Petri a razón de 8 ml. por placa y se deja solidificar a temperatura ambiente.

Este medio se utilizó para el aislamiento de bacterias causales productoras de mastitis, diferentes a micoplasmas.

² Laboratorios Oxoid

³ Laboratorios Difco

MATERIAL Y METODOS

2.2.1.2.- Medio de Hayflick modificado

A) Para esterilizar en autoclave

Caldo PPLO ⁴	2'1	g
Agar PPLO ⁵	34	g
Agua desionizada	70	ml

B) Componentes filtrados por membrana

Suero de ternera inactivado	20	ml
Extracto de levadura fresca	10	ml
Ampicilina (100 mg/ml)	0'25	ml
Acetato de talio (10 % p/v)	0'25	ml
Cloruro de trifeniltetrazolio	1'0	ml
ADN de timo de ternero (0'2 %)	1'0	ml

Se ajusta a pH 7'6-7'8 con NaOH (1M).

Los componentes del grupo A se esterilizan en autoclave a 120°C durante 15 minutos, y los componentes del grupo B se esterilizan con filtros de diámetro inferior a 0'25 μ .

Una vez esterilizados todos los componentes y ajustado el pH se

⁴ Para medio líquido. Laboratorios Difco

⁵ Para medio sólido. Laboratorios Difco

MATERIAL Y METODOS

mezclan homogéneamente y se reparten 4 ml en tubos estériles el medio de Hayflick líquido; y para la obtención del medio Hayflick sólido se vierte en placas de Petri a razón de 3 ml. en placas de 5 cm. de diámetro.

El cultivo se incubó en atmósfera aerobia (37°C).

En primer lugar se realizan las siembras en el medio líquido (1 ml. de muestra), y a partir de esta dilución traspasamos 1ml a un segundo tubo e igualmente de este segundo tubo resembramos 1 ml. en un tercer tubo, con el fin de diluir la contaminación que impediría el crecimiento de los micoplasmas. Estas siembras las empezamos a controlar a partir del segundo día para observar los posibles crecimientos.

Una vez que se observa crecimiento en el medio líquido, procedemos a realizar la siembra en el medio sólido, la cual la realizamos por inundación de las placas de Petri a partir de la dilución de la muestra que ofrezca menor nivel de contaminación con una cantidad de 300 μ l y posteriormente, una vez que eliminamos el sobrante ya se llevan a la estufa para su incubación.

Las placas se incubaron en atmósfera aerobia a 37°C y en cámara húmeda para evitar la deshidratación del medio inspeccionándolas cada dos días durante un mínimo de quince días.

2.3.- DETERMINACION DE UNIDADES FORMADORAS DE COLONIAS

Se realizó para cuantificar la carga bacteriana que estaba presente en la mama en los casos de mastitis subclínica.

Para ello se hicieron diluciones 1:10, 1:100 y 1:1000 en solución salina con cada muestra y posteriormente se sembró 100 μ l de cada una de ellas en placas de Petri con ágar sangre. Se incubaron a 37°C durante 24 horas en aerobiosis y se procedió a su contaje a la dilución que mejor se observaban.

Se consideró que las ubres presentaban infección cuando en el medio de cultivo crecían 5 ó más unidades formadoras de colonias por 0'01 ml. (MANSER, 1986).

MATERIAL Y METODOS

2.3.1.- SOLUCIONES

2.3.1.1.- *Solución salina fisiológica*

Cloruro sódico 9 g

Agua destilada 1000 ml

Separar en tubos de 10 ml. y esterilizar en autoclave a 120°C, durante 15 minutos.

Esta solución se empleó para realizar las diluciones de las muestras de leche necesarias para cuantificar las unidades formadoras de colonias.

2.4.- PRUEBA DE CALIFORNIA MASTITIS TEST

La prueba de California para el diagnóstico de las mastitis, es rápida, fácil y sencilla, que tiene especificidad para leucocitos en leche. Para ello hemos empleado "Drofilsa Mastitis"⁶, que constituye un reactivo que mezclado convenientemente con una cantidad de leche permite detectar si procede de una mama inflamada, sea cual fuere su grado.

Para la realización de esta técnica se han seguido las indicaciones del reactivo comercial "Drofilsa Mastitis", cuya lectura de reacción está basada en los estudios realizados por O. W. SCHALM y cols.,(1971).

2.4.1.- FUNDAMENTO DE LA REACCIÓN

Es sabido que cualquier estado inflamatorio va siempre acompañado de gran afluencia focal de células, principalmente de leucocitos. En las mastitis la leche es rica en glóbulos blancos.

⁶ Drosan, S.A.

MATERIAL Y METODOS

En esta prueba, se utiliza un reactivo (Drofilsa Mastitis) de superficie aniónica y un indicador, el púrpura de bromocresol; dicho reactivo, tiene la especial cualidad de modificar su estado físico cuando se pone en contacto con proteínas de origen celular, alterándose visiblemente, adquiriendo un estado que va desde la simple precipitación en los casos leves hasta la completa y total formación de un gel viscoso que se pega al fondo del recipiente y apreciable con toda claridad.

2.4.2.- TECNICA DE LA REACCIÓN

El proceder de la reacción consiste en depositar en cada una de las tacitas de una paleta de plástico, un pequeño chorro de leche de cada mama individual del animal, de tal forma que quede en cada recipiente una cantidad aproximada de unos 2 c.c., procurando que el contenido de la tacita no pase a otro.

A continuación, se vierte en cada recipiente un chorrito del reactivo (unos 2 c.c.). Esta cantidad nunca debe ser menor, porque podría ser insuficiente para desarrollar la reacción. En cambio, una cantidad ligeramente superior no influye en nada la marcha de la reacción.

Acto seguido se ejercen unos ligeros movimientos oscilatorios de agitación circular para que los líquidos queden perfectamente mezclados, apreciándose en el transcurso de varios segundos, en caso positivo, la aparición de un precipitado en los casos muy leves y un gel viscoso muy visible cuando la afección es mayor.

Para la investigación de otras muestras, basta lavar con agua la paleta y tacitas y dejarlas escurrir, sin necesidad de secarlas.

La leche debe ser fresca o mantenida en lugar frío y no transcurrir más de 36 horas desde el ordeño hasta la realización de la técnica. La leche calentada, acidificada por las bacterias o envejecida no da resultados satisfactorios para esta prueba.

2.4.2.1.- Lectura de la reacción

* **Negativa** (-): la mezcla de los líquidos permanece fluída, sin modificación de la consistencia. Color gris perla-violeta.

* **Dudosa** (+/-): ligera alteración de la consistencia, que desaparece al poco tiempo. Color gris perla-violeta.

* **Débilmente positiva** (+): aumento de la consistencia, sin que llegue a gelificación. Color gris perla-violeta.

* **Positiva** (++): aumento rápido de la consistencia, con escasa gelificación. Al realizar movimientos circulares la mezcla tiende a colocarse en el centro, dejando libre los bordes de la tacita. Al cesar los movimientos, la mezcla se extiende uniformemente por todo el suelo de la taza. Color ligeramente violeta.

* **Fuertemente positiva** (+++): fuerte aumento de la consistencia, con gelificación que ocasiona una superficie convexa, que ni siquiera en reposo ocupa todo el suelo de la taza. Color violeta intenso.

Como sea que esta prueba demuestra la presencia de proteínas celulares, da resultado positivo en las leches calostrales y en las procedentes de animales en periodo de secado, pues como es sabido son ricas en materia celular (SCHALM y cols., 1971).

Siguiendo indicaciones previas hemos considerado una lectura de positividad a partir del nivel débilmente positivo (+) (SCHALM y cols., 1971; MELLEBERGER, 1979; PETERSEN, 1981; POUTREL y LERONDELLE, 1983).

2.5.- METODO COULTER-COUNTER

El *Coulter-Counter* es un aparato diseñado para contar y clasificar según su tamaño partículas de dimensiones submilimétricas que se encuentran en suspensión en un electrolito.

Se trata de un contador electrónico de partículas basado en el principio de recuento por variación de resistencia, como se expone a continuación, siguiendo las indicaciones recomendadas por la "INTERNATIONAL DAIRY FEDERATION" (1981).

2.5.1.- FUNDAMENTO DEL METODO

El núcleo de un contador de partículas según el principio de variación de resistencia, es un tubo de vidrio en uno de cuyos extremos existe un pequeño orificio calibrado, (generalmente de 100 ó 70 μ m. de diámetro).

Este tubo está lleno de un electrolito apropiado y se introduce en un recipiente que contiene la muestra de leche a analizar, convenientemente dispersa en el mismo electrolito. Dos electrodos de platino, de superficie relativamente grande, se encuentran situados uno en el interior y otro en el exterior del tubo de contaje.

Entre ambos electrodos se establece una diferencia de potencial (aproximadamente, de 300 voltios). El único camino libre para que la corriente fluya de uno a otro es a través del orificio practicado en el tubo de vidrio. Debido a sus pequeñas dimensiones, dicho orificio presenta una resistencia eléctrica apreciable en función de su diámetro, espesor de paredes y también de la resistividad del electrolito.

Mediante un sistema de aspiración se fuerza a la dilución de la muestra a pasar desde el recipiente que la contiene al interior del tubo de contaje, a través del orificio calibrado. Cada vez que una partícula (de resistividad superior al electrolito), atraviesa el orificio, la sección útil de éste disminuye y, en consecuencia, su resistencia eléctrica aumenta.

MATERIAL Y METODOS

Si los dos electrodos se alimentan a partir de una fuente de intensidad constante, como es el caso en la práctica, estas variaciones de resistencia se traducen en impulsos de tensión, que pueden ser registrados en un contador electrónico apropiado.

Un dispositivo automático controla la cantidad de muestra analizada en cada caso e interrumpe el recuento al llegar a un volumen predeterminado, por lo general 0'05, 0'5 ó 2 ml. De esta forma puede determinarse fácilmente la concentración de partículas por unidad de volumen de muestra.

El aparato dispone de un circuito discriminador que permite eliminar aquellos impulsos eléctricos que no alcancen cierta altura mínima, seleccionable por el operador. Ello equivale a decir que sólo serán contabilizadas aquellas partículas que superen cierto tamaño umbral.

Mediante una calibración adecuada, puede establecerse exactamente el umbral crítico a partir del cual se detectan las partículas en cada caso. Por sustracción de dos recuentos sucesivos, efectuados a umbrales distintos, puede establecerse el número de partículas de tamaño comprendido entre ambos márgenes.

La sensibilidad del contador es máxima para las partículas comprendidas entre un 2 y un 40 por 100 del diámetro del orificio. Existen tubos de contaje intercambiables calibrados de 3 a 1000 micras, de modo que el campo de medida de los instrumentos se extiende en condiciones ideales, desde 0'06 hasta 400 μm de diámetro (CASADO y BLANCO, 1978).

2.5.2.- METODOLOGIA DE LA TECNICA EMPLEADA

Para el recuento de las células somáticas en leche, hay que tener la precaución de eliminar los glóbulos grasos, cuyo tamaño puede ser en muchos casos similar al de las células somáticas y, en consecuencia, podrían dar lugar a recuentos erróneos por exceso.

La técnica de recuento mediante el contador electrónico requiere el empleo de muestras de leche que hayan sido previamente estabilizadas, para

MATERIAL Y METODOS

lo cual las muestras a examinar son sometidas a la acción de una solución de formol durante un período de 18 a 24 horas.

Una vez completado el proceso de estabilización, que hace a las células resistentes a los tratamientos posteriores, se procede a la eliminación de los glóbulos grasos de la muestra. Para ello se tratan con un reactivo diluyente, constituido por una mezcla de un tensoactivo y de alcohol en una solución salina, que disuelve la materia grasa en caliente.

La disolución total de los glóbulos grasos se realiza a una temperatura de 80°C. Antes de presentar la muestra al contador es conveniente dejarla enfriar hasta la temperatura a la cual se ha calibrado el instrumento (por lo general, la temperatura ambiente), puesto que la constante de calibración volumétrica es función de la temperatura del electrolito.

El resultado final expresado en número de células somáticas por mililitro de muestra, se obtiene multiplicando el recuento obtenido en el aparato por el factor de corrección correspondiente al volumen de muestra medido.

2.5.2.1.- Calibración del aparato para el contaje celular de leche de cabra

Para llevar a cabo la calibración del *Coulter-Counter* hemos seguido un método de recuento medio, para el cual se debe seleccionar partículas de látex cuyo diámetro sea entre un 5-20% al diámetro del tubo, idealmente el 10%.

En nuestro trabajo utilizamos una sonda de 100 μm y unas partículas de látex de 9.9 μm , de las cuales se agregaron varias gotas a la cubeta con el electrolito filtrado, colocando esta cubeta sobre la plataforma del *Coulter-Counter* y mezclándolo homogéneamente con el agitador del aparato. Posteriormente utilizando el teclado para la calibración del aparato introdujimos un volumen del manómetro de 100 μl , y un diámetro de apertura de 100 μm .

Una vez introducidos estos valores para llevar a cabo la calibración



MATERIAL Y METODOS

abrimos el mando de *RESET* y fijamos el umbral inferior en 10 y el umbral superior en 99.9, además de ajustar la atenuación y ganancia hasta obtener pulsos de 2-3 cm en la pantalla.

Una vez que se obtuvieron estos impulsos se hicieron dos recuentos y se promediaron, llamando a este valor *FULL COUNT*. Este valor se dividió por dos y se registró para luego ajustar el umbral inferior hasta que obtuvimos un recuento coincidente al del *FULL COUNT/2*, llamando a este valor de umbral T (estimado). Luego ajustamos el umbral inferior a 1/2 de T (estimado) e hicimos dos recuentos y los promediamos, llamando a este valor de umbral T/2.

El siguiente paso de la calibración consistió en ajustar el umbral inferior a 1 1/2 del T (estimado) e hicimos igualmente dos recuentos y los promediamos, llamando a este valor de umbral 3/2 T.

El recuento a T (calculado) se determinó del siguiente modo:

$$\frac{\text{Recuento a T/2} + \text{Recuento a 3/2 T}}{2}$$

Una vez determinado este cálculo, volvimos al valor original T (estimado) y ajustamos el dial hasta que obtuvimos un recuento correspondiente al cálculo anterior, registrando este valor de umbral como T (calculado), teniendo en cuenta que T (calculado) menos T (estimado) puede variar ± 2.0 divisiones.

Posteriormente se pulsó la tecla *CAL* e ingresamos mediante teclado el diámetro medio del látex utilizado en la calibración. De este modo, el instrumento quedó calibrado con una constante $K_d = 14'52$ que la calcula automáticamente el aparato.

Una vez calibrado el aparato *Coulter-Counter* fijamos el umbral inferior a un rango de 15 en el cual contamos partículas de un diámetro superior a 4 μm , para de este modo evitar en lo posible el contaje de partículas bacterianas que podían estar suspendidas en las muestras de leche a analizar.

2.5.2.2.- Estabilización de las muestras de leche

Se añade a cada 10 ml de la muestra de leche un volumen de 0'2 ml de solución acuosa al 10 por 100 de formaldehído y 0'02 por 100 de eosina (para identificar las muestras tratadas). Las muestras se conservan durante un periodo de dieciocho a veinticuatro horas a 30°C.

Después de la estabilización, las muestras pueden conservarse durante dos semanas bajo refrigeración o de cinco a siete días a temperatura ambiente (TOLLE y cols., 1966).

Si el examen es urgente, la estabilización puede efectuarse calentando la muestra adicionada de formol durante treinta minutos a 60°C.

2.5.2.3.- Preparación de la muestra para el recuento

a) Preparación del líquido diluyente para la disolución de los glóbulos grasos:

Para preparar 1000 ml de reactivo diluyente se han mezclado los siguientes volúmenes de los productos que se indican: 855 ml de solución de cloruro sódico al 0'9%, 125 ml de etanol al 96% y 20 ml de Tritón X-100⁷ (8- fenol 10-etilenglicoléter).

Para facilitar la disolución de Tritón X-100 se calentó la mezcla a 40-60°C. El pH de la mezcla se ajustó a 7, añadiendo una solución tampón "Bacto hemagglutination buffer"⁸, evitándose así la posible precipitación de las proteínas de la leche.

⁷ Laboratorios Panreac

⁸ Laboratorios Difco

MATERIAL Y METODOS

El reactivo así preparado se filtra para reducir al mínimo el número de partículas extrañas, que no ha de ser mayor de 100 partículas por mililitro al tamaño umbral del recuento de células. Para ello, se utilizaron filtros⁹ estériles de acetato de celulosa con poros de diámetro inferior a 0'45 μm .

Este reactivo, que se utilizará también como electrolito en el *Coulter-Counter*, puede conservarse en frascos de vidrio limpios durante varias semanas antes de su uso.

b) Tratamiento de la muestra con el reactivo diluyente:

El tratamiento de la muestra con el reactivo diluyente para disolver y eliminar la interferencia de los glóbulos grasos se verifica de la siguiente forma:

En primer lugar, se agitan vigorosamente los frascos que contienen la muestra de leche estabilizada durante cinco a seis segundos para emulsionar la materia grasa, dejándoles reposar a continuación durante uno a tres minutos para que desaparezca la espuma formada. Inmediatamente antes de medir la leche para el tratamiento se invierten de nuevo los frascos tres o cuatro veces para conseguir la uniformidad de la muestra.

Se añaden en un tubo de ensayo, perfectamente limpio y exento de partículas, 9'9 ml de reactivo diluyente y 0'1 ml de la muestra. Se calienta después la solución en un baño de María a 80°C durante diez minutos, cuidando que el nivel de la leche esté por lo menos 15 mm por debajo del nivel del agua.

A medida que los glóbulos de grasa se disuelven, la solución se hace transparente. La opalescencia de la solución después de la incubación es debida a las partículas de caseína que no se disuelven. Estas partículas están por debajo del tamaño umbral y no interfieren en el recuento celular.

Finalmente, la solución se enfría a la temperatura ambiente, mejor

⁹ Laboratorios Sartorius

por inmersión de los tubos en agua fría.

2.5.2.4.- Recuento celular

El aparato empleado para el recuento fue un *Coulter-Counter* modelo ZM¹⁰. El recuento se efectuó en el espacio de una hora u hora y media después del tratamiento de las muestras. Se tomó especial cuidado en que los recipientes a los que se transfirieron las muestras para la realización del recuento estuviesen exentos de partículas.

Solamente en el caso de un recuento excesivamente alto es necesario enjuagar con el electrolito el recipiente y la sonda del contador entre una muestra y otra.

El *Coulter-Counter* debe adaptarse para la medida de 0'1 ó 0'5 ml de la suspensión celular a través de un orificio de 100 μ l; la resistencia de este orificio debe ser de 26.000 ohmios, aproximadamente.

El recuento celular de una muestra es tomado como el valor promedio de los recuentos sucesivos obtenidos al tamaño umbral apropiado, previamente hallado en el calibrado del aparato. Con cada lote de muestras debe realizarse una prueba en blanco, tomando en vez de la muestra electrolito calentado; y si el recuento sobrepasa las 100 partículas por mililitro, el valor obtenido deberá restarse del promedio del recuento celular de la muestra.

Si N es el número promedio de células hallado, una vez realizada la corrección por el ensayo en blanco, el resultado final del recuento de células por mililitro de leche es el siguiente:

$$\text{N}^{\circ} \text{ células/ml} = \frac{\text{N} \times \text{factor de dilución}}{\text{Volumen de susp. medida}}$$

¹⁰ Modelo ZM, Coulter Electronics, Ltd.

MATERIAL Y METODOS

Los resultados obtenidos siguiendo esta técnica presentan una buena reproductibilidad con un coeficiente de variación menor del 3 por 100, siendo su correlación con el método microscópico de S. C. PRESCOTT y BREED, 1910.

Hemos considerado la existencia de mastitis subclínica cuando se presentaron contajes celulares superiores a 1.5×10^6 células/ml (SHELDRAKE, 1981; POUTREL y cols., 1983; LERONDELLE y POUTREL, 1984).

2.6.- FOSSOMATIC

Considerando la importancia de la valoración de este método para el estudio de las mastitis subclínicas y a causa de no disponer del mismo para la determinación de los contajes celulares, las muestras de este estudio se han enviado al Instituto Lactológico de Lekumberri (Navarra) para llevar a cabo la cuantificación del número de células de las muestras de leche.

Se han seguido las indicaciones recomendadas por la "INTERNATIONAL DAIRY FEDERATION" (1981).

2.6.1.- FUNDAMENTO

El aparato *Fossomatic* es fundamentalmente un microscopio de funcionamiento continuo mediante el que se realiza el recuento de células somáticas que previamente han sido marcadas con un colorante fluorescente.

Este colorante (bromuro de etidio) reacciona con el DNA contenido en el núcleo de las células somáticas, formando un complejo de luz que emite una fuerte fluorescencia roja cuando se somete a la luz azul. Cada célula produce un impulso eléctrico que es ampliado y recogido por el aparato.

No existe interferencia en el recuento debido a los demás compuestos de la leche. Parte del colorante puede también combinarse con los grupos fosfato de la membrana de los glóbulos grasos, pero el complejo formado

emite una luz fluorescente cuya longitud de onda es inferior a la emitida por las células.

Las bacterias de la leche no presentan dificultades porque su coloración es extremadamente lenta.

2.6.2.- METODOLOGIA

El procedimiento a seguir es el siguiente:

Las muestras de leche sin tratar se conservan con dicromato potásico al 0'2 %; de esta forma se pueden almacenar hasta 7 días en refrigeración.

A la hora de procesar las muestras, éstas se precalientan en un baño de agua a 40°C, se agitan y posteriormente se colocan bajo la pipeta del aparato que toma 0'2 ml de muestra, lo mezcla con la solución tampón y el colorante (bromuro de etidio) y traspasa parte de esa muestra en forma de fina película (0'5 mm. de ancho y 10 micrones de espesor) a un disco rotatorio que sirve como objetivo plano del microscopio.

El microscopio utilizado es de haz incidente, o sea que tanto la iluminación como la observación del objeto tienen lugar a través del mismo objetivo.

La fuente luminosa, que es una lámpara de arco xenón, se enfoca a través de un sistema óptico y se filtra para proporcionar luz de excitación azul. La luz viene reflejada mediante un espejo dicróico y se enfoca sobre la película de líquido, previamente preparada sobre un disco que rota bajo el objetivo del microscopio.

Cuando pasan bajo el microscopio, las células somáticas que han reaccionado con el colorante son excitadas por la luz azul y emiten por consiguiente, fluorescencia roja. Cada célula produce un impulso eléctrico que es ampliado y recogido. El número de células somáticas se imprime en miles/ml.

MATERIAL Y METODOS

Hemos considerado que existía mastitis subclínica en las muestras que presentaron un contaje celular superior a 5×10^5 células/ml (POUTREL y LERONDELLE, 1983; PERNTHANER y cols., 1991; SIERRA y cols., 1992).

2.6.3.- PREPARACION DE REACTIVOS

2.6.3.1.- Solución buffer

Hidrógeno potásico	51'0 g
Hidróxido potásico	13'75 g
Tritón X-100 (1 %)	10 ml
Agua desionizada	10000 ml

Ajustar a pH 5'7-5'9 añadiendo una solución de hidróxido potásico.

Esta solución se emplea para la disolución del colorante y las muestras de leche con el aparato Fossomatic.

2.6.3.2.- Solución de tinción

2.6.3.2.1.- Solución de tinción concentrada

Bromuro de etidio	1 g
Agua desionizada	1000 ml

Esta solución se almacena protegida de la luz y del aire no más de 60 días.

MATERIAL Y METODOS

2.6.3.2.2.- Solución de trabajo

Solución de tinción concentrada 20 ml

Solución buffer 1000 ml

Esta solución la utiliza el contador de partículas *Fossomatic* para la dilución de las muestras de leche.

2.7.- INMUNODIFUSION RADIAL

La inmunodifusión radial (RID), bien con difusión limitada (MANCINI y cols., 1965) o bien con difusión cronometrada (FAHEY y McKELVEY, 1965), es el método más ampliamente empleado para cuantificar seroinmunoglobulinas (y otras seroproteínas), y es el que se acepta para estandarización de sueros de referencia (JACKSON y DAVIS, 1984).

Hemos practicado la técnica descrita por G. MANCINI y cols., (1965).

2.7.1.- FUNDAMENTO

En el método de inmunodifusión radial uno de los dos reactantes (por lo común el anticuerpo) es uniformemente distribuido en una capa de gel de agarosa, mientras que el otro reactante (usualmente el antígeno) se introduce en concavidades circulares practicadas en el gel.

El antígeno difunde en forma radial en la mezcla gel-anticuerpo, formando un anillo visible de precipitado en un punto que depende de la estequiometría antígeno-anticuerpo.

A medida que difunde hacia afuera el antígeno, el anillo de precipitación se disuelve en exceso de antígeno y reaparece a una distancia mayor de la concavidad. Este incremento en el diámetro del anillo de precipitado continúa con el tiempo, hasta que antígeno y anticuerpo alcanzan

MATERIAL Y METODOS

el equilibrio (MANCINI y cols., 1965; JACKSON y DAVIS, 1984).

Existen ciertas relaciones cuantitativas entre el diámetro del anillo y la concentración de antígeno, tanto para cuando el anillo se está expandiendo como cuando deja de agrandarse (MANCINI y cols., 1965). En este último caso, difusión limitada, la curva que representa el cuadrado del diámetro (D^2) en función de la concentración, es lineal.

No obstante, la difusión limitada se puede realizar sólo si se utiliza la concentración correcta de anticuerpo (a saber, la concentración debe ser lo suficientemente baja como para dar anillos medibles a baja concentración de antígeno, pero lo bastante elevada como para que haya exceso de anticuerpo a altas concentraciones de antígeno) (MANCINI y cols., 1965).

2.7.2.- OBTENCIÓN DE ANTI-IgG DE CABRA

Se han seguido las indicaciones de E. HARLOW y LANE (1988).

2.7.2.1.- Preparación del inóculo de IgG

Previamente a la preparación del inóculo se disolvieron 10 mg de IgG¹¹ de cabra liofilizada con 15 ml de solución salina estéril.

Por cada animal que se inoculara se realiza una mezcla de 1'2 ml de esta disolución, en la cual la IgG se encuentra en una concentración de 0'8 mg, con 2 ml de adyuvante de Freund¹² completo, hasta conseguir una buena homogenización del mismo, para lo cual se hace pasar esta mezcla a través de una jeringuilla varias veces.

Las jeringuillas de plástico son apropiadas para todo tipo de

¹¹ Sigma Immuno Chemicals

¹² Laboratorios Sigma

MATERIAL Y METODOS

inyecciones excepto cuando se usa adyuvante de Freund, en cuyo caso se recomienda la utilización de jeringuillas de cristal.

La solución de Freund es uno de los mejores adyuvantes para conseguir respuestas de estimulación fuertes y prolongadas (HARLOW y LANE, 1988). Aunque la principal desventaja de este adyuvante de Freund es que puede provocar granulomas persistentes y agresivos.

Con el fin de evitar la mayoría de los efectos secundarios de estos adyuvantes, la inyección inicial se debe administrar con AFC (Adyuvante de Freund Completo), mientras que todas las revacunaciones se deben de hacer con AFI (Adyuvante de Freund Incompleto¹³).

2.7.2.2.- Protocolo de inoculación

Para la obtención del antisuero se han empleado 3 conejos de unos 2 Kg de peso de raza Californianos, procedentes de una explotación con un excelente nivel sanitario.

A cada uno de los conejos se les administró el inóculo con IgG caprina repartiéndolo en 10 inyecciones subcutáneas por diversas zonas del organismo, comenzando por uno de los lados cerca de la parte posterior del cuello, donde se pellizca la piel con dos dedos y se separa del cuerpo para así introducir la aguja en el espacio creado, evitando que ésta no se inserte en los músculos o pared corporal, y una vez que se deposita la cantidad deseada y se retira la aguja se presiona en ese punto de inoculación para evitar que el inóculo se salga; y del mismo modo se procede hasta repartir todo el inóculo en 10 zonas distintas.

Tras 5 semanas de la realización de la primera inoculación, se obtuvo sangre de los conejos a través de la vena marginal de la oreja con el fin de valorar el título de anticuerpos frente a diluciones de la IgG de cabra, cuya técnica queda explicada y detallada en el apartado 2.7.5.

¹³ Laboratorios Sigma

MATERIAL Y METODOS

Una vez comprobada la respuesta inmunógena por parte de los conejos, se les aplicó una revacunación con el mismo inóculo aplicado en la primera inyección pero esta vez con adyuvante de Freund incompleto, para así producir una buena hiperinmunización; y a partir de la cual se realizó a los 15 días la sangría de los animales, en donde se les extrajo la sangre mediante punción cardiaca.

Una vez obtenida la sangre, se centrifugó a 3000 r.p.m. durante 5 minutos, y el suero se conservó a -20°C en diversos tubos ependorff disponibles para su utilización en la elaboración de las placas de inmunodifusión.

2.7.3.- PREPARACIÓN DE REACTIVOS

2.7.3.1.- *Buffer de glicina*

Por cada litro de buffer se añade 7'5 g de glicina a unos 600 ml de agua destilada; luego se agrega 100 ml de EDTA 0'4 M.

Esta mezcla se ajusta a pH 7'0 con NaOH 1 N, y se lleva hasta un litro controlando el pH.

2.7.3.2.- *EDTA¹⁴ 0'4 M*

Se agregan 152 g de EDTA (ácido etilen-dinitrilo-tetraacético), sal tetrasódica (peso molecular 380'20), y 148'9 g de EDTA, sal disódica dihidratada (peso molecular 372'21), a 900 ml de agua destilada, y se agita con agitador magnético hasta su completa disolución. Luego se lleva a un litro ajustando el pH hasta 7'8.

¹⁴ Laboratorios Oxoid

2.7.3.3.- Agarosa al 2 %

En un Erlenmeyer de 2 litros, se añaden 40 g de agarosa¹⁵ humedecidos con 300 ml de buffer de glicina frío, y luego se agregan los 1700 ml de buffer restante calentado.

El matraz se coloca sobre un agitador magnético, y se agita calentando hasta obtener una solución clara y evitando que la solución de agarosa hierva. Estando aún caliente, se vierten 20 ml de ésta en tubos de ensayo, se dejan enfriar y luego se tapan herméticamente para evitar la evaporación. Una vez así preparados se pueden conservar a 5°C.

Este sistema de agarosa-EDTA se emplea fundamentalmente por la razón de que impide la alteración de algunas seroproteínas, específicamente los componentes del complemento (JACKSON y DAVIS, 1984).

2.7.4.- PREPARACION DE LAS PLACAS DE DIFUSION

(1) Se rotulan tres placas de agar de 6'2 por 8'1 cm indicando las diluciones 1:5, 1:10 y 1:20.

(2) Se pipetea 2 ml, 1 ml y 0'5 ml, respectivamente, de antisuero en tubos de ensayo rotulados 1:5, 1:10 y 1:20, y se colocan en un baño de agua a 56°C.

(3) Luego se disuelven 40 ml de agarosa al 2 % en baño maría hirviendo y se transfiere al baño de agua a 56°C. Cuando la solución de agarosa se enfría a 56-60°C, se introduce parte de ésta en una pipeta serológica de 10 ml y se deja escurrir. Se repite dos o tres veces para calentar la pipeta, y luego se pipetea 8 ml, 9 ml y 9'5 ml de agarosa, respectivamente, en los tubos rotulados 1:5, 1:10 y 1:20. Posteriormente se mezclan bien los contenidos mientras los tubos permanecen en el baño de agua a 56°C.

¹⁵ Laboratorios Panreac

MATERIAL Y METODOS

(4) Inmediatamente se transfiere el contenido de cada tubo a las placas de agar correspondientes, colocadas sobre una superficie a nivel, evitando la formación de burbujas de aire. La capa de agarosa resultante es de unos 2 mm de espesor.

(5) Una vez solidificado, se cubren las placas y se dejan enfriar a temperatura ambiente, durante 20 a 30 minutos.

(6) Utilizando una plantilla en la que la distancia entre los orificios fuera aproximadamente de un cm (de tal modo que al realizarse la inmunodifusión no interfieran unos pocillos con otros), y con un sacabocado se practican los orificios. Las concavidades resultantes pueden contener unos 7 μ l.

(7) Las placas preparadas de este modo pueden conservarse a 4°C durante 2 semanas.

(8) Una vez ensayada las distintas concentraciones de antisuero, obtuvimos los mejores resultados a la dilución 1:20, con la cual realizamos la técnica de inmunodifusión.

2.7.5 ENSAYOS CON LOS SUEROS

2.7.5.1.- Obtención de la curva estándar de referencia

(1) Previamente se diluye el suero de referencia o el estándar de trabajo con solución salina 1:2 para la IgG (JACKSON y DAVIS, 1984). La IgG de referencia (10 mg) se diluyeron en 2 ml de solución salina, por lo que se encontraba en una concentración inicial de 5 mg/ml.

(2) El suero de referencia diluido como se ha indicado (100 %), y las posteriores diluciones al 50, 25, 12'5 y 6'25 % de este estándar, se utilizan para llenar las primeras cinco concavidades de 2 filas distintas.

(3) Una vez así preparadas, se incuban las placas en cámara húmeda a 37°C, durante 20-24 horas.

MATERIAL Y METODOS

(4) Transcurrido este periodo de tiempo, se procede a medir los diámetros. Para ello se invierte la placa sobre un soporte que permite el paso de luz en forma oblicua de una lámpara de alta potencia colocada abajo. Se miden los diámetros con una regla y se registran los datos.

Si los anillos son ligeramente ovalados en vez de redondos, se toma el promedio de dos medidas efectuadas formando ángulo recto entre sí. Cuando los anillos son grandes o desdibujados, con bordes poco definidos, significa que el antisuero está muy diluido; y si los anillos son demasiado pequeños, está demasiado concentrado.

(5) Para la obtención de la curva estándar, se representa el porcentaje del estándar de referencia (estándar de trabajo) en ordenadas y cuadrados de los diámetros en milímetros cuadrados (D^2) en abscisas. Y se traza la mejor recta posible.

Si la línea abarca la escala de concentraciones de interés, puede usarse; si no, se debe variar el tiempo, la temperatura y la concentración de reactantes.

(6) Se debe determinar la mayor dilución de antisueros que produce anillos de uno 7 mm con los estándares altos. Anillos de aproximadamente 4 mm se deben obtener con el estándar de trabajo diluido al 12'5 %. Los diámetros que sean menores de 3'5 mm no se pueden leer usualmente con exactitud.

(7) Se debe repetir este protocolo con distintas diluciones de antisueros hasta lograr los resultados óptimos. Como hemos indicado anteriormente, obtuvimos resultados óptimos con una dilución del antisuero a 1:20.

2.7.5.2.- Cuantificación de sueros de cabras

Previamente a la utilización de las placas se dejan a temperatura ambiente unos 20 a 30 minutos y se alinean en una gradilla las diluciones del estándar de trabajo y los sueros de los animales utilizados en esta fase experimental.

MATERIAL Y METODOS

Una vez que estuvieron preparadas las placas y los sueros, se agregó un volumen constante de muestra en las concavidades, empleando una micropipeta; teniendo la precaución de llenar las concavidades exactamente a nivel del lecho de agarosa, evitando además que se formaran burbujas de aire o se derramara suero fuera de las concavidades.

La distribución de estándares y desconocidos se realizaron al azar por toda la placa, y una vez agregadas todas las muestras, se incubaron las placas a 37°C en cámara húmeda.

Una vez cumplido el tiempo de difusión adecuado, se leyeron y calcularon el cuadrado de los diámetros de los anillos, y a partir de la curva de referencia, se determinó el porcentaje de suero de referencia y se convierten en concentración con la curva estándar (cuadro 1), (ROWE y cols., 1972).

Cuadro 1. Conversión del porcentaje de suero de referencia a concentración de inmunoglobulina

% de suero referencia	Concentración de IgG	
	mg/100ml	UI/ml
100	2396	298
75	1793	223
50	1198	149
25	595	74
12'5	297	37

III.3.- CALCULO DE LA SENSIBILIDAD Y ESPECIFICIDAD DE LAS TECNICAS EMPLEADAS.

La sensibilidad y especificidad de una prueba diagnóstica son

MATERIAL Y METODOS

importantes a la hora de decidir el valor de dicha prueba en las campañas de control de la enfermedad y en la clasificación de los animales en estudios observacionales.

La sensibilidad de un método diagnóstico es la proporción de verdaderos positivos que son detectados por el método en cuestión. La especificidad del método es la proporción de verdaderos negativos que son detectados (THRUSFIELD, 1990).

La sensibilidad y especificidad se han expresado en porcentajes y determinados de la siguiente manera (THRUSFIELD, 1990):

Posibles resultados de una prueba diagnóstica

Categoría según la prueba	Categoría verdadera		Total
	Enfermo	No enfermo	
Enfermo	a	b	a+b
No enfermo	c	d	c+d
Total	a+c	b+d	a+c+b+d

Sensibilidad= $a/(a+c)$
Especificidad= $d/(b+d)$

Hemos calculado estos datos comparando los resultados obtenidos en la determinación de unidades formadoras de colonias de las muestras de leche analizadas con respecto a los valores que presentaron cada una de las técnicas, *Fossomatic*, *Coulter-Counter* y *California Mastitis Test*.

III.4.- METODOS ESTADISTICOS

Los estudios estadísticos se han realizado en base a la aplicación de los siguientes métodos (SOKAL y ROHLF, 1979):

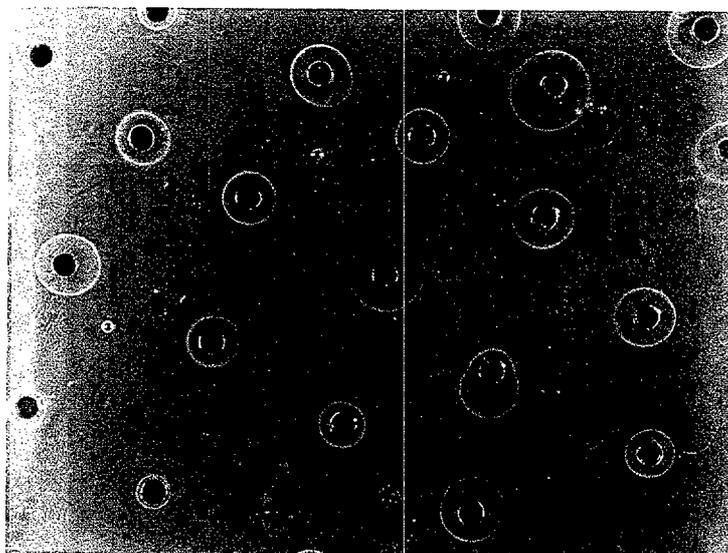
MATERIAL Y METODOS

Para el estudio de los análisis de la varianza en los distintos lotes de edad a lo largo de la lactación en la primera experiencia se ha aplicado la distribución *F de Snedecor*.

Se ha aplicado la *t de Student* para comparar en la primera experiencia los valores celulares de las técnicas *Fossomatic*, *Coulter-Counter* y *California Mastitis Test* entre el grupo de animales sanos y animales con mastitis subclínica. En la segunda experiencia se ha aplicado la *t de Student* para comparar los niveles de la concentración de IgG en la leche entre los animales sanos y animales con mastitis subclínica.

El cálculo del coeficiente de correlación ente los distintos métodos se ha determinado con el denominado *Coficiente de Correlación producto-momento (Karl Pearson)*.

MATERIAL Y METODOS



Técnica de inmunodifusión radial con difusión limitada (MANCINI y cols., 1965), empleada para cuantificar IgG en el suero lácteo del ganado caprino

IV.- RESULTADOS

RESULTADOS

IV.1.- EXPERIENCIA I.

1.1.- ESTADO DE SALUD DE LAS GLANDULAS MAMARIAS DEL REBAÑO ESTUDIADO EN BASE AL CONTROL BACTERIOLOGICO.

1.1.1.- RESULTADOS BACTERIOLOGICOS

De acuerdo con los datos obtenidos por MANSER (1981) para considerar la presencia de mastitis subclínica en el ganado caprino y que describimos en el apartado -III.2.2.- de material y métodos, hemos obtenido los siguientes resultados:

De un total de 77 cabras investigadas en esta fase experimental, a las cuales les hicimos el seguimiento a lo largo del periodo de una lactación completa y sin que en ningún momento mostraran síntomas clínicos de mastitis, obtuvimos que 37 (46'25 %) de ellas presentaron en algún o algunos meses de este periodo mastitis subclínicas, y las 40 (53'75 %) cabras restantes se encontraban sanas o sin infección.

1.1.2.- ETIOLOGIA DE LAS MASITIS SUBCLINICAS EN LOS ANIMALES ESTUDIADOS

De un total de 1078 muestras de leche procesadas aislamos 37 cepas diferentes, que correspondían a distintas especies bacterianas (tabla I, gráfico 1), de las cuales las bacterias aisladas con mayor prevalencia resultaron ser los estafilococos coagulasa negativos 16 (43'24 %), y en porcentajes menores obtuvimos en 12 ocasiones (32'43 %) enterobacterias, 5 (13'51 %) fueron debidas a estafilococos coagulasa positivos y 4 (10'82 %) restantes se presentaron con infecciones mixtas debidas a estafilococos coagulasa negativos y enterobacterias.

RESULTADOS

En esta fase experimental la presencia de micoplasmas no se investigó, ya que la detección de los mismos (excepto determinadas especies que pueden crecer en agar sangre) requieren periodos de incubación mayores o de medios específicos que no fueron utilizados en este estudio. Además en el momento que iniciamos la experiencia y durante su desarrollo no tuvimos ningún antecedente de enfermedad por esa etiología en el colectivo estudiado.

1.2.- EVALUACION DEL CONTAJE CELULAR EN LA LECHE DE LA CABRA CANARIA.

1.2.1.- VALORES CELULARES FISIOLÓGICOS.

Los resultados obtenidos con el método directo de cuantificación celular en leche mediante *Fossomatic* (tabla II, gráfico 2) en el grupo de animales sanos han oscilado a lo largo del periodo de la lactación con unas medias aritméticas comprendidas entre $349'28 \times 10^3$ células/ml y $671'46 \times 10^3$ células/ml, coincidiendo el mayor registro con el final de este periodo.

Atendiendo a los resultados de estos contajes celulares estableciendo distintos grupos según la edad de los animales estudiados, se observa que en el lote de animales más jóvenes, de 3 años (tabla III), muestran los niveles más bajos en el número de células contenidas en la leche comparado con los demás lotes de animales mayores (tablas IV, V y VI), sólo presentando contajes comparables a los niveles de los demás en el último mes de la lactación, que es donde se han registrado los mayores contajes celulares en este lote en su ciclo de la lactación.

Los contajes celulares se comprueba que van aumentando con la edad, aunque son bastantes similares en los meses intermedios de la lactación entre los lotes que comprende las edades de 6-7 años y de 8-9 años (tablas V y VI).

En todos los lotes de animales sanos los mayores registros del número de células coinciden con la etapa final de la lactación. También en general, excepto en el lote de 4 años de edad (tabla IV), todos comienzan con un número elevado de contaje celular que disminuye en el siguiente mes de lactación.

RESULTADOS

La representación gráfica (gráfico 2) de los contajes celulares con este método *Fossomatic*, independientemente de la edad, nos describe una curva en la que se produce un ligero descenso a partir del primer mes de la lactación, y aunque con tendencia de ir aumentando se mantiene con unos niveles celulares bastante homogéneos en los estadios intermedios de este periodo, pero que en las etapas finales de la lactación se presenta un aumento acentuado de los mismos.

Al desglosar esta curva con respecto a los lotes de edades (gráficos 3, 4, 5 y 6) aunque se observa que en todos estos lotes sanos tienen tendencias similares de descender después del primer mes de lactación, y a partir de aquí gradualmente va ascendiendo hasta el último mes de la misma, se aprecia que la morfología de estas curvas se van presentando más irregulares a medida que los lotes son de mayor edad, siendo en el de mayor edad donde la curva presenta picos de ascensos y descensos más variables.

La variabilidad de estos datos representada por las desviaciones típicas de las medias de los contajes celulares (gráficos 3 y 4) también son menores en los lotes de animales más jóvenes que corresponde a los de 3 y 4 años de edad, presentándose más amplias en los lotes con edades comprendidas entre 6-7 años (gráfico 5) y 8-9 años (gráfico 6).

En general, en todos los lotes se observan las desviaciones típicas de las medias de los contajes celulares más amplias en el correspondiente al último mes de la lactación, aunque en los lotes de mayor edad (gráficos 5 y 6), también son bastante amplias en el primer mes de este periodo.

Los resultados de la cuantificación celular obtenidos con el método directo *Coulter-Counter* (tabla II) en el grupo de animales sanos se nos han presentado con unas medias aritméticas que han oscilado entre $860'32 \times 10^3$ células/ml y $1.341'99 \times 10^3$ células/ml.

Los contajes celulares registrados con el método *Coulter-Counter* al igual que ocurre con el *Fossomatic* nos muestra los valores más pequeños en el lote de animales de menor edad (tabla III, gráfico VIII), y a medida que los lotes van aumentando de edad, este método fue registrando cada vez contajes más elevados del número de células en la leche, siendo en el lote de mayor edad (8 y 9 años) (tabla VI, gráfico XI) donde se registraron los valores del número de células más elevados.

RESULTADOS

Excepto en el lote de 3 años, en el cual el registro mayor fue en el inicio de la lactación, en todos los demás lotes los registros mayores se produjeron tanto en el inicio como al final de la lactación.

Las curvas que reflejan los contajes celulares realizados con el *Coulter-Counter* (gráficos 7, 8, 9, 10 y 11) en todos los lotes muestran una morfología bastante similar, caracterizada con un descenso acentuado a partir del primer mes de lactación y con un pico de ascenso coincidente con el tercer mes, que es registrado en todos los lotes de animales sanos, donde luego vuelve a descender para ascender nuevamente hacia el final de la etapa de lactación.

Dentro de estos lotes, el de mayor edad (tabla VI, gráfico 11) es el que ha presentado una morfología más irregular, al presentar picos tanto en el tercer como en el quinto mes de la lactación, datos similares a los obtenidos con el método *Fossomatic*.

Las desviaciones típicas de las medias de los contajes celulares (tablas III, IV, V y VI, gráficos 8, 9, 10 y 11) se registraron con mayor amplitud tanto en el inicio como en el final de la lactación de todos los lotes, independiente de la edad, siendo las más destacadas las correspondientes al primer mes del ciclo del lote de 4 años (tabla IV, gráfico 9) y la del último mes de lactación del lote de animales con edades comprendidas con 8 y 9 años (tabla VI, gráfico 11).

En todos los lotes de los animales sanos se observa que los contajes registrados con el método *Coulter-Counter* superan con diferencia a los contajes registrados con el método *Fossomatic*, en una proporción que suele ser aproximadamente el doble en los meses intermedios, y del triple tanto en el primer mes como en el último de la lactación, lo cual queda claramente reflejado en las tablas III, IV, V y VI, y en los gráficos 12, 13, 14, 15 y 16.

Además de la cuantificación de los contajes celulares con estos métodos directos en las muestras procesadas del grupo de animales sanos, realizamos una estimación con el *California Mastitis Test* (tabla VII), con el cual observamos en el primer mes de lactación un elevado porcentaje (79'41 %) de animales que dan negatividad al mismo, y el 20'59 % restante presenta una positividad entre los niveles de reacción 1 y 2.

RESULTADOS

Esta positividad observada en el primer mes de lactación va disminuyendo en los meses siguientes, alcanzándose el menor porcentaje de positividad (3'55 %) en el cuarto mes de lactación, pero a medida que los meses se van aproximando hacia el final del periodo de producción, se incrementa de nuevo el porcentaje de positividad, alcanzando un 17'54 % de los animales niveles de positividad en el último mes de lactación (a nivel de reacción 1 y 2).

Si comparamos la distribución de los resultados al *California Mastitis Test* entre los cuatro lotes establecidos en el grupo de animales sanos, se observa que el lote de animales sanos más joven (tabla VIII, gráfico 18), de 3 años de edad, es el que presenta un mayor porcentaje de negatividad a la lectura de la reacción, mostrando un nivel muy escaso de positividad que corresponde tanto al inicio como al final del ciclo de la lactación.

En los restantes lotes (tablas IX, X y XI) se observan mayores índices de positividad, aunque en general coincidiendo siempre tanto con la etapa de comienzo como de finalización de la lactación, y aunque en algunos casos muestren positividad en los meses intermedios, éste es del nivel de lectura 1, que corresponde a una reacción débilmente positiva.

Una lectura de la reacción al *California Mastitis Test* del nivel 3, que nos indica una reacción fuertemente positiva nunca fue observada en los distintos lotes de diferentes edades de animales sanos a lo largo de la lactación, siendo lo más destacado en todos estos grupos y en todos los meses el elevado porcentaje de animales que dieron negativo a la reacción de esta prueba (tablas IX, X y XI).

La representación gráfica (gráficos 17, 18, 19, 20 y 21) nos muestra el elevado porcentaje de animales sanos que han dado una lectura negativa a la reacción, siendo el lote de animales más jóvenes el que presenta mayor índice de negatividad y no presentó ninguna lectura positiva del nivel 2 ó superior, los cuales sí se presentaron en el resto de los lotes de animales sanos.

Si comparamos los resultados obtenidos con el *California Mastitis Test* con los resultados de contajes celulares realizadas con los métodos directos *Fossomatic* y *Coulter-Counter* se puede observar la existencia de una correlación, ya que los niveles de la lectura de reacción al *California Mastitis*

RESULTADOS

Test han mostrado un elevado porcentaje de negatividad correspondiente a esos animales sanos, apreciándose un aumento de los niveles de positividad con valores entre 1 y 2 (tabla VII), tanto en el inicio como en el final de la lactación, lo cual ha coincidido con el aumento celular detectado en estos periodos tanto con el método *Fossomatic* como con el *Coulter-Counter* (tabla II).

1.2.2.- VALORES CELULARES EN LECHE DE CABRA CON MASTITIS SUBCLINICA.

Los resultados obtenidos con la técnica *Fossomatic* (tabla XII, gráfico 22) en el lote de cabras con mastitis subclínica se han presentado con unas medias elevadas a lo largo de toda la duración de la lactación, variando entre la mínima ($1.908'69 \times 10^3 \pm 1.717'32$ cél./ml) que se produjo en el segundo mes, y la máxima ($3.393'83 \times 10^3 \pm 2.148'33$ cél./ml) que se presentó en el sexto mes de la misma.

En cuanto a los contajes celulares obtenidos con la técnica *Coulter-Counter* (tabla XII) en este grupo de animales con infecciones mamarias han mostrado unos valores medios que han variado entre ($3.282'28 \times 10^3 \pm 2.536'08 \times 10^3$ cél./ml) en el tercer mes y ($7.244'78 \times 10^3 \pm 8.563$ cél./ml) presentados en el séptimo mes de la lactación.

La representación gráfica del contaje celular realizada con *Fossomatic* y *Coulter-Counter* (gráfico 22) nos muestra una variación paralela a lo largo de todo el ciclo de la lactación, pero al igual que ocurría con los animales sanos estudiados, en esta última técnica se ha mostrado con contajes celulares en leche proporcionalmente más elevados, que han sido del orden de dos a siete veces superiores a los valores del *Fossomatic* según los casos.

Comparando estos resultados (tabla XII) de contajes celulares en el grupo de animales con mastitis subclínica con los obtenidos en el grupo de animales sanos (tabla II), se observa que con ambos métodos se han registrado un aumento considerable de los valores celulares en leche en los animales que presentaban infección subclínica.

En el estudio de la distribución de los resultados al *California Mastitis*

RESULTADOS

Test (tabla XIII) en el lote de cabras con mastitis subclínica no se han presentado diferencias notables entre las muestras recogidas en los diferentes momentos de la lactación de cada animal infectado.

En todos los meses que ha comprendido la misma (tabla XIII) se ha presentado un porcentaje de animales que han mostrado una negatividad media a la lectura de la reacción de 42'36%, siendo estos porcentajes un poco más bajos tanto al inicio (39'13 %) como al final (33'33) de la lactación. Un nivel de lectura 3 que corresponde a una reacción fuertemente positiva se ha presentado en todos los meses a lo largo de la lactación.

El nivel de positividad de presentación más frecuente en este lote (tabla XIII) ha sido el correspondiente al nivel 2.

En la curva (gráfico 23) de la distribución de los resultados al *California Mastitis Test* se puede apreciar que el grupo de animales que dieron reacciones negativas muestran una morfología inversa a la desarrollada por el grupo de animales sanos (gráfico 17), ya que los porcentajes del grupo de animales con mastitis subclínica que demostraron negatividad son menores tanto en el inicio como en las etapas finales de la lactación, y más elevadas en las etapas intermedias de este ciclo.

Considerando la etiología de las mastitis subclínicas, los valores de contaje celular en leche en este lote de animales dió resultados muy superiores a los que muestra el lote sano en todos los casos, incluso en las infecciones por estafilococos coagulasa-negativos.

Los contajes celulares realizados con la técnica de *Fossomatic* (tabla XIV, gráfico 24) en animales que presentaron mastitis subclínica con este grupo de bacterias mostraron unos valores medios que oscilaron entre $1.375'29 \times 10^3 \pm 1.087'16 \times 10^3$ cél./ml y $2.968'00 \times 10^3 \pm 2.624'03 \times 10^3$ cél./ml.

Si comparamos estos contajes celulares con los obtenidos en el grupo de animales sanos (tabla II) se observa que el número de células en cabras con mastitis subclínicas debidas a estafilococos coagulasa-negativos (gráfico 24) son notablemente mayores que en animales sanos, e incluso se aprecia bastante diferencia si dentro del grupo de animales sanos los comparamos con el de mayor edad (que presentaban los valores más elevados).

RESULTADOS

Los resultados obtenidos con el método *Coulter-Counter* (tabla XIV) en este grupo de animales han mostrado unos contajes medios a lo largo del periodo de la lactación que han oscilado entre $2.303'27 \times 10^3 \pm 1.311'72 \times 10^3$ cél/ml y $13.128'00 \times 10^3 \pm 13.387'57 \times 10^3$ cél./ml). Estos últimos que han sido los más elevados se obtuvieron en el primer mes de lactación.

1.2.3.- VALORES DE SENSIBILIDAD Y ESPECIFICIDAD DE LAS TECNICAS EMPLEADAS

La prueba indirecta de contaje celular en leche con el *California Mastitis Test* (tabla XV) ha ofrecido una sensibilidad del 76 p. 100 y una especificidad del 86 p. 100.

El método directo de contaje celular con *Fossomatic* (tabla XVI) ha presentado una sensibilidad del 85 p. 100 y una especificidad del 88 p. 100.

En cuanto a la prueba directa de contaje celular con el método *Coulter-Counter* (tabla XVII) nos ha dado unos resultados de sensibilidad de un 67 p. 100 y una especificidad del 89 p. 100.

Con la elaboración de todos estos resultados hemos obtenido que la técnica de mayor sensibilidad ha sido la mostrada por el *Fossomatic*, y que en cuanto a especificidad, todas ellas, tanto el *California Mastitis Test*, *Fossomatic* y *Coulter-Counter*, han mostrado niveles muy similares, variando entre el 86 y el 89 p. 100.

1.3.- ANALISIS ESTADISTICOS

Los resultados obtenidos con el método directo de cuantificación celular en leche mediante *Fossomatic* (tabla II, gráfico 2) en el grupo de animales sanos han oscilado a lo largo del periodo de la lactación con unas medias aritméticas comprendidas entre $349'28 \times 10^3$ células/ml y $671'46 \times 10^3$ células/ml, coincidiendo el mayor registro con el final de este periodo. A pesar de ello, el análisis estadístico de estos resultados no mostró diferencias significativas a favor de este incremento observado al final de la lactación.

RESULTADOS

Atendiendo a los resultados de estos contajes celulares estableciendo distintos grupos según la edad de los animales estudiados, se observa que en el lote de animales más jóvenes, de 3 años (tabla III), presentaron niveles significativamente más bajos en el número de células contenidas en la leche ($p < 0.01$) comparado con los determinados en los demás lotes de animales mayores (tablas IV, V y VI). En este grupo se observó en el último mes de la lactación los mayores registros de contajes celulares, pero seguía mostrando en este mes diferencias significativas ($p < 0'05$) con respecto a los otros lotes de animales.

El análisis pormenorizado atendiendo a esta variable (edad de los lotes) a lo largo de los meses que comprende la lactación para valorar a qué grupo de animales se debe esa diferencia significativa en cada mes, manifiesta que dichas diferencias significativas son atribuibles al grupo de tres años en los muestreos realizados el primer, segundo, tercer, cuarto y séptimo muestreo ($p < 0'05$, $p < 0'01$, $p < 0'01$, $p < 0'01$, $p < 0'05$ respectivamente), mientras que en los análisis realizados los meses quinto y sexto de la lactación, no fue posible establecer la determinación de un componente aditivo de tal significación, o se atribuyó al grupo de mayor edad como ocurrió en el muestreo realizado en el sexto mes ($p < 0'025$).

Siguiendo un protocolo similar al llevado a cabo con el método anterior, se procedió al análisis estadístico de los resultados obtenidos con el método *Coulter-Counter*, cuyos resultados (tabla II) en el grupo de animales sanos, de forma general no se apreciaron diferencias estadísticamente significativas en los muestreos realizados a lo largo de la lactación, no ocurriéndolo mismo si consideráramos los animales divididos en cuatro grupos de edad y considerando este factor (edad) como fuente de variación.

En cada uno de los muestreos realizados no siempre fue posible atribuir a un grupo en concreto el origen de las variaciones observadas incluso en algunos casos estas no llegaron a apreciarse como fue el caso del primer muestreo y en el tercero mientras que en los restantes las diferencias estadísticas fueron $p < 0'05$, $p < 0'01$, $P0'01$, $P 0'01$, $P 0'01$ para los meses segundo, cuarto, quinto, sexto y séptimo respectivamente.

Mediante la prueba de *F de Snedecor* se pudo determinar que las diferencias observadas mediante el análisis de la varianza podían ser atribuidas al grupo de 3 años en el muestreo realizado en el cuarto mes de

RESULTADOS

lactación ($P < 0'05$) mientras que para los restantes casos estas determinaciones o bien no fueron posibles o se deben a otros grupos como el de 8-9 años en el quinto mes de lactación ($P < 0'01$) o entre el grupo de animales entre 3 y 5 años respecto al grupo de 6 a 9 en el sexto mes de lactación ($P < 0'01$).

En cuanto al método *California Mastitis Test* (tabla VII) al igual que lo observado con las técnicas anteriores aunque la curva que refleja los resultados a lo largo de la lactación considerando el total de los animales (gráfico 17) se aprecian algunas oscilaciones a lo largo de lactación, estas diferencias tampoco resultaron ser significativas.

Al igual que lo observado con el método *Fossomatic* y *Coulter-Counter* al separar los animales teniendo en cuenta las distintas edades se pudieron observar diferencias significativas en los contajes de unos y otros. También con el *California Mastitis Test* se apreciaron estas diferencias significativas comparando los distintos lotes de edades de animales (gráficos 18, 19, 20 y 21), pero solamente durante los meses intermedios de la misma (tercer, cuarto y quinto mes), ya que tanto en las etapas iniciales como últimas de la lactación no se observaron diferencias significativas entre los distintos grupos de animales. Estas diferencias se atribuyeron al grupo de animales más joven, el de 3 años ($P < 0'05$) con respecto a los otros grupos.

Al comparar las curvas establecidas con los métodos *Fossomatic* (tabla II, gráfico 2), *Coulter-Counter* (tabla II, gráfico 7) y *California Mastitis Test* (tabla VII, gráfico 17) se observa que existe cierta correlación, pero para demostrar si tal correlación aparente es estadísticamente significativa o no, hemos aplicado el *test de coeficiente de correlación producto-momento*.

Entre los métodos *Fossomatic* y *Coulter-Counter* hemos obtenido, sin diferenciar los distintos meses de la lactación, que presentan una correlación significativa ($P < 0'01$). Este índice de correlación fue igualmente observado al considerar cada uno de los meses de la lactación, siendo el grado de significación de $P < 0'01$ durante todos los meses, excepto en el sexto mes que fue más elevada ($P < 0'001$).

Sin embargo, el índice de correlación obtenido con el *California Mastitis Test* tanto con el *Fossomatic* como con el *Coulter-Counter* no se mostró estadísticamente significativo tanto comparando las técnicas

RESULTADOS

globalmente como considerando cada uno de los meses de la lactación.

Comparando los resultados de los contajes celulares en el grupo de animales sanos (tabla II) con los obtenidos en el grupo de animales con mastitis subclínicas (tabla XII), se observa que con ambos métodos, *Fossomatic* ($P < 0'001$) y *Coulter-Counter* ($P < 0'001$), se han registrado un incremento significativo de los valores celulares en leche en los animales que presentaban infección subclínica. Con el método *California Mastitis Test*, también se aprecia un incremento de los niveles de la lectura de la reacción aunque no son tan altamente significativos ($P < 0'05$) como con las técnicas anteriores.

Considerando la etiología de las mastitis subclínicas, los valores de contaje celular en leche con los distintos métodos también se mostraron superiores con las infecciones causadas por los estafilococos coagulasa-negativos (tablas XIV y XV, gráfico 2). Al comparar estos resultados con el grupo de animales sanos apreciamos incrementos significativos tanto con el método *Fossomatic* ($P < 0'001$), *Coulter-Counter* ($P < 0'001$) como con el *California Mastitis Test* ($P < 0'05$).

RESULTADOS

IV.2.- EXPERIENCIA II.

2.1.- CONCENTRACION DE IgG EN LECHE DE CABRAS SANAS

La concentración de IgG (tabla XVIII, gráficos 25 y 26) presentes en la leche en el lote de cabras sanas se ha presentado con el nivel más elevado en el primer día de la lactación ($10'89 \pm 2'19$ mg/ml), y tanto en los días siguientes a éste como en los diversos controles periódicos a lo largo de la lactación, se ha ido produciendo un descenso gradual de estas inmunoglobulinas en la leche, hasta alcanzar unos niveles medios hacia el sexto mes de lactación de $2'43 \pm 0'52$ mg/ml.

La curva (gráficos 25 y 26) que describe la concentración media de estas inmunoglobulinas en leche presenta un descenso que es más acentuado durante la primera semana de la lactación, ya que entre los días 7 y 10 postparto se detecta una concentración de IgG en leche que es la mitad de la presentada en el primer día de la lactación. Luego el descenso se hace más gradual hasta llegar a unos niveles que se mantienen más estables durante los controles realizados en el quinto y sexto mes.

Las desviaciones típicas de estas medias de la concentración de IgG en leche también son un poco más variables al principio de la lactación, y se presentan más estables en los últimos controles realizados.

2.2.- CONCENTRACION DE IgG EN LECHE DE CABRAS CON MASTITIS SUBCLINICAS.

Los resultados obtenidos (tabla XIX y gráfico 27) de la medición de los niveles de IgG en la leche de cabras que presentaron mastitis subclínica oscilaron entre unas medias de $3'26 \pm 1'74$ mg/ml obtenidos en el primer mes de la lactación y $1'33 \pm 1'13$ mg/ml en el sexto mes de este periodo.

RESULTADOS

Si comparamos estos resultados de IgG en la leche con los obtenidos en el lote de cabras sanas (tabla XVIII), se observa que los niveles de esta inmunoglobulina en animales con mastitis subclínica (tabla XIX y gráfico 28) siempre se presentaron en concentraciones inferiores a las observadas en los animales sanos.

La curva (gráfico 27) que describe las medias de las concentraciones de estas inmunoglobulinas en el lote de cabras con mastitis subclínica presenta un descenso después del primer mes de lactación, y un pico correspondiente al segundo mes de este periodo, luego la evolución en los meses de lactación es de un descenso gradual.

Del estudio bacteriológico de las 32 mitades de ubres del grupo de 16 cabras que presentaron mastitis subclínica obtuvimos los siguientes resultados (tabla XX, gráfico 29): en 16 (50'00 %) se presentaron estafilococos coagulasa negativos, en 3 (9'38 %) se presentaron infecciones mixtas debidas a estafilococos coagulasa negativos y enterobacterias, en 2 (6'25 %) se aislaron micoplasmas, en 1 (3'13 %) fueron debidas a enterobacterias, y 1 (3'13 %) se encontraron *Bacillus spp.*

Al comparar la concentración de IgG (gráfico 30) en leche entre el grupo de cabras sanas con el grupo de cabras con mastitis subclínica teniendo en cuenta las distintas especies aisladas, podemos observar que existen diferencias notables a la comparación realizada entre el grupo de animales sanos (gráfico 28) con el de mastitis subclínica sin diferenciar las especies.

De esta manera el grupo de cabras que presentaron mastitis subclínica debidas a estafilococos coagulasa negativos (gráfico 30) presentó durante todos los meses que se realizaron controles a lo largo de la lactación niveles de la concentración de esta inmunoglobulina por debajo a los obtenidos en el grupo de animales sanos. No ocurre lo mismo para las mastitis subclínicas producidas por el resto de las especies bacterianas aisladas.

Excepto en el primer mes de la lactación que aunque presente niveles más bajos que en las cabras sanas la concentración de IgG en leche observada en este grupo de animales con infecciones subclínicas debidas a estafilococos coagulasa negativos (gráfico 30), en el resto de los meses de la

RESULTADOS

lactación se presentó con unos niveles bastante inferiores que corresponde aproximadamente a la mitad de la concentración observada en el grupo de animales sanos.

En el grupo de animales con mastitis subclínica debidas a micoplasmas (gráfico 30), a los cuales se les pudo hacer el seguimiento durante cuatro controles de la lactación, se observa que excepto en el segundo mes del ciclo de la lactación en que presentaron unos niveles de IgG en leche ligeramente inferiores a los obtenidos en el grupo de animales sanos, en el resto de las ocasiones en que fueron aislados mostraron una concentración de esta inmunoglobulina en leche en unos niveles superiores a las encontradas en dicho grupo.

Sin embargo, la comparación de la concentración de IgG en leche entre el grupo de cabras sanas con el de aquellos en que la mastitis subclínica fue debida a enterobacterias, que se hizo el seguimiento durante tres controles, se ha mostrado diferente (gráfico 30), pues en todas las ocasiones en este tipo de mastitis se presentaron con unos niveles de esta inmunoglobulina en la leche superior a las observadas en el grupo de animales sanos, siendo en el segundo mes de la lactación en unos niveles que doblan a las concentraciones de IgG en la leche del grupo de las cabras sanas. La infección de la ubre por especies de esta familia bacteriana es también la que ha provocado los valores más elevados de IgG en los controles realizados.

También en el grupo de cabras con mastitis subclínicas debidas a la presencia de *Bacillus spp.* (gráfico 30), que se hizo el seguimiento durante cinco controles, presentaron unos niveles de la concentración de IgG en leche que superan a los niveles observados en el grupo de animales sanos, siendo más acentuado este aumento en el primer y tercer mes. Sin embargo, en los meses restantes de la lactación sólo se muestran con una concentración que es ligeramente superior a la observada en las cabras sanas.

De la obtención de todos estos resultados de los niveles de IgG en la leche de cabras con mastitis subclínica podemos aseverar que aquellas debidas a estafilococos coagulasa negativos han presentado unos niveles de IgG bastante inferiores a los niveles de esta inmunoglobulina en leche en el grupo de animales sanos, no siendo así para el resto de bacterias aisladas en las mastitis subclínicas, las cuales mostraron casi siempre unos niveles de IgG

RESULTADOS

que superaban a los observados en la leche del grupo de animales sanos.

Los resultados de los contajes celulares con métodos directos en este grupo de animales con mastitis subclínica quedan reflejados en la tabla XXI y gráfico 31, en los cuales se observa que los contajes realizados con la técnica *Fossomatic* se presentan con unos niveles elevados pero que se mantienen bastantes constantes a lo largo del periodo de la lactación.

Si la curva (gráfico 31) que describe estos contajes la comparamos con la que confieren los niveles de IgG en estas leches (gráfico 27) se observa que no existe correlación entre ambas, ya que la que describe el *Fossomatic* es bastante lineal a lo largo de la lactación.

Los resultados de los contajes celulares realizados con la técnica *Coulter-Counter* (tabla XXI y gráfico 31) en este grupo de animales con mastitis subclínica, también se han presentado bastantes elevados pero no tan homogéneos a lo largo de la lactación como la técnica *Fossomatic*, ya que muestra un ascenso acentuado en el segundo y tercer mes de la lactación.

Al comparar la curva (gráfico 31) que describe el contaje celular con *Coulter-Counter* o con *Fossomatic* con la curva (gráfico 27) obtenida de la medición de los niveles de IgG en este grupo de animales con mastitis subclínica tampoco se observa que exista una relación, pues aunque en el segundo mes coincida un pico en la curva de IgG con un aumento celular con el *Coulter-Counter*, en el siguiente mes en el cual también se produce un aumento celular, los niveles de IgG sin embargo disminuyen.

Con la valoración de estos resultados se observa que no existe relación entre los niveles de IgG en leche con los contajes celulares determinados en las mismas muestras.

Los resultados obtenidos al *California Mastitis Test* (tabla XXII y gráfico 32) en este grupo de animales con mastitis subclínica nos muestra un aumento del porcentaje de animales que dan una lectura de la reacción del nivel 2 y 3 en el tercer y quinto mes de la lactación, lo que comparado con los contajes celulares determinados con el *Fossomatic* y *Coulter-Counter* (tabla XXI y gráfico 31), coincidiría con la evolución que desarrolla el *Coulter-Counter*, ya que con esta técnica se presentaron aumentos en esos meses.

RESULTADOS

2.3.- ANALISIS ESTADISTICOS

Al comparar los resultados obtenidos de la medición de los niveles de IgG en la leche de cabras que presentaron mastitis subclínicas (tabla XIX y gráfico 27) con los valores obtenidos en los animales sanos sin considerar las distintas etiologías no se aprecian diferencias significativas entre ambos valores, y tampoco al considerar exclusivamente las muestras de ubres infectadas por estafilococos coagulasa-negativos.

V.- DISCUSION

V.1.- EXPERIENCIA I.

1.1.- ESTADO DE SALUD DE LAS GLANDULAS MAMARIAS DE LOS ANIMALES ESTUDIADOS EN BASE AL CONTROL BACTERIOLOGICO

1.1.1.- ETIOLOGIA DE LAS MASTITIS SUBCLINICAS EN EL GANADO CAPRINO

La leche extraída directamente de la ubre del animal contiene una carga microbiana, por lo que es importante definir cuándo las muestras son bacteriológicamente positivas para considerarlas mastitis subclínicas. En el ganado caprino se ha considerado que las muestras de leche son bacteriológicamente positivas (tenidas en cuenta las medidas de asepsia oportunas para la recogida de las mismas) cuando un mismo patógeno se aísla en dos o tres exámenes consecutivos (ANDREWS y cols., 1983; KALOGRIDOU-VASSILIADOU, 1992), o bien cuando se aíslan cinco o más unidades formadoras de colonias tras la siembra de 0'01 mlilitro de cada muestra en los medios de cultivos habituales (MANSER, 1981).

Del total de 1.078 muestras procesadas de leche de cabra en nuestro estudio un 53'75% no presentaron infecciones subclínicas, estos hallazgos son un poco inferiores a los obtenidos por B. POUTREL y LERONDELLE (1983), A. C. HUNTER (1984) y C. LERONDELLE y POUTREL (1984), quienes encontraron que las muestras de leche libres de infección constituían el 69'4, 75 y 67'4% respectivamente. Sin embargo contrastan con los resultados obtenidos por D. KALOGRIDOU-VAASILIADOU y cols. (1992), los cuales observaron unos elevados índices de mastitis subclínicas, ya que sólo el 18'6% de las muestras de leche examinadas estaban libres de infección.

Estos elevados porcentajes de ubres caprinas con infecciones subclínicas se atribuyen a las escasas medidas higiénicas practicadas en las granjas (SMITH y ROGUINSKY, 1977; KALOGRIDOU-VASSILIADOU y cols., 1992) donde no se lleve a cabo un control sistemático basado en el lavado y desinfección de las manos de los ordeñadores, de los utensilios de

DISCUSION

ordeño o limpieza y desinfección de los pezones (BAXENDELL, 1985; CRIPPS, 1986; KALOGRIDOU-VASSILIADOU y cols., 1992).

En nuestros resultados obtuvimos que en un 46'25% de los animales estudiados presentaron mastitis subclínica en algún o algunos meses del periodo de la lactación, lo cual es indicativo que en el ganado caprino (SHELDRAKE y cols., 1981; POTREL, 1984; MAISI, 1990b; MAISI y RIIPINEN, 1991; KALOGRIDOU-VASSILIADOU y cols., 1992) al igual que ocurre en el bovino (KLEINSCHROTH y cols., 1989; CULLOR y cols., 1990) el verdadero problema de las mastitis son estas infecciones subclínicas debido a su elevada presentación, y al no ser detectadas constituyen un verdadero peligro para el estado sanitario de las ganaderías.

Muchas de estas infecciones subclínicas persistieron durante varios meses a lo largo de la lactación, infecciones persistentes que han sido observadas por diversos investigadores, incluso a través del periodo de secado (NESBAKKEN, 1978; POUTREL, 1984; MAISI y RIIPINEN, 1991; KALOGRIDOU-VASSILIADOU, 1992).

Las mastitis (clínica y subclínicas) en el ganado caprino pueden deberse a una gran variedad de microorganismos (MANSER, 1985; EL-YAS y NASHED, 1988; BUSWELL y cols., 1989; KALOGRIDOU-VASSILIADOU, 1991; MAISI y RIIPINEN, 1991).

Se ha observado que los microorganismos patógenos más significativos asociados con las mastitis caprinas son similares a aquellos encontrados en las ubres bovinas, como por ejemplo los estafilococos hemolíticos y no hemolíticos, estreptococos, etc. (SMITH y ROGUINSKY, 1977; PEREZ y SCHULTZ, 1979; KLEINSCHROTH y cols., 1989; CULLOR y cols., 1990; KALOGRIDOU-VASSILIADOU, 1991).

Los microorganismos patógenos se han clasificado según su grado de patogenicidad en patógenos mayores y patógenos menores (GRIFFIN y cols., 1977). Los patógenos mayores comprometen a (a) *Staphylococcus aureus*, (b) estreptococos (principalmente *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus dysgalactiae* y *Streptococcus uberis*), (c) bacilos Gram-negativos (d) micoplasmas. Los patógenos menores comprometen a (a) estafilococos coagulasa-negativos (b) micrococos (c) corinebacterias. Aunque se ha observado que en el ganado caprino numerosas especies de estafilococos

DISCUSION

coagulasa-negativos poseen una patogenicidad intermedia (MAISI y RIIPINEN, 1991).

De las distintas especies bacterianas aisladas por nosotros, los estafilococos han sido los principales organismos presentes en las mastitis subclínicas (SMITH y ROGUINSKY, 1977; POUTREL, 1984; KALOGRIDOU-VASSILIADOU, 1991; MAISI y RIIPINEN, 1991; CONTRERAS DE VERA y cols., 1992) y dentro de este grupo de bacterias los estafilococos coagulasa-negativos fueron los que se presentaron con mayor prevalencia, lo cual coincide con los resultados obtenidos por la mayoría de los autores (ROGUINSKY y cols., 1971; PETTERSEN, 1981; DULIN y cols., 1982; POUTREL y LERONDELLE, 1983; LERONDELLE y POUTREL, 1984; MANSER, 1986; KALOGRIDOU-VASSILIADOU, 1991; MAISI y RIIPINEN, 1991; KALOGRIDOU-VASSILIADOU y cols., 1992).

En nuestro estudio el porcentaje de estafilococos coagulasa negativos fue de un 43'24%, resultados muy similares a los obtenidos por POUTREL y LERONDELLE (1983) que fue de un 41'6%. Sin embargo, otros autores han obtenido porcentajes menores entre un 20-24% (HUNTER, 1984; LERONDELLE y POUTREL, 1984) y en otros considerablemente mayores entre un 65-98% (SHELDRAKE y cols., 1981; DULIN y cols., 1982; KALOGRIDOU-VASSILIADOU y cols., 1992).

Aunque la prevalencia de las infecciones debidas a estafilococos coagulasa-negativos subclínicas sean elevadas, sin embargo su importancia ha sido ampliamente debatida (SHELDRAKE y cols., 1981; POUTREL, 1984; MAISI y RIIPINEN, 1991). En nuestros resultados al igual que en los de diversos autores estas infecciones pueden persistir a lo largo de los meses que comprende la lactación (NESBAKKEN, 1978; POUTREL, 1984; MAISI y RIIPINEN, 1991), por lo que tales resultados no apoyan el punto de vista de que estas infecciones pueden presentarse y desaparecer de un día para otro, lo cual sugiere que se tratan de verdaderas infecciones de las ubres (NESBAKKEN, 1978; POUTREL, 1984; MAISI y RIIPINEN, 1991; KALOGRIDOU-VASSILIADOU, 1992).

Además, se ha observado que estos microorganismos provocan un incremento del contaje de células somáticas y una disminución de la producción de leche, por lo que se han considerado patógenos genuinos de las ubres caprinas (ROGUINSKY y cols., 1971; HOLMBERG, 1973; SMITH y

DISCUSION

ROGUINSKY, 1977; hinckley Y COLS., 1985).

En la mayoría de los países, *Staphylococcus aureus* es la etiología predominante de las mastitis subclínicas (**WILSON y RICHARDS, 1980; KALOGRIDOU-VASSILIADOU, 1991**) y también de los casos clínicos (**BRAMLEY y DODD, 1984; FERRER y cols., 1993**), pero la prevalencia de estas bacterias suele ser siempre menor que los estafilococos coagulasa-negativos (**SMITH y ROGUINSKY, 1977; PEREZ y SCHULTZ, 1979; HUNTER, 1984; LERONDELLE y POUTREL, 1984; KALOGRIDOU-VASSILIADOU, 1991; FERRER y cols., 1993**).

Un 32'43% de las cepas aisladas fueron enterobacterias, estos resultados contrastan con los de numerosos autores, los cuales las han aislados en porcentajes bastantes menores (**HUNTER, 1984; MANSER, 1986; KALOGRIDOU-VASSILIADOU, 1991; CONTRERAS DE VERA y cols., 1992**). Aunque en general los porcentajes del número total aislado de estas bacterias sean bajos, en muchos rebaños estas bacterias son los patógenos secundarios más importantes (**KALOGRIDOU-VASSILIADOU, 1991**).

A pesar de que generalmente la incidencia de estas infecciones sean bajas pueden producirse brotes cuando se presentan condiciones que incrementan la exposición de estos microorganismos (**PHILPOT, 1979; CULLOR y cols., 1990; KALOGRIDOU-VASSILIADOU, 1991**). Los microorganismos coliformes abundan en el estiércol y en las camas de los animales, mientras que las mastitis por *seudomonas* pueden originarse de aguas contaminadas o de máquinas de ordeño lavadas inadecuadamente (**PHILPOT, 1979; BAXENDELL, 1985; KLEINSCHROTH y cols., 1989; CULLOR y cols., 1990; KALOGRIDOU-VASSILIADOU, 1991**).

En nuestros aislamientos bacteriológicos nunca encontramos cepas del Género *Streptococcus*. Estos resultados están en concordancia con la baja prevalencia de estreptococos recogida por numerosos autores (**HUNTER, 1984; BAXENDELL, 1985; MANSER, 1986; EAST y cols., 1987; KALOGRIDOU-VASSILIADOU, 1991; CONTRERAS DE VERA y cols., 1992**) lo que se ha sugerido que en determinados países este Género tiene poco significado como causa de las mastitis caprinas. Aunque diversas especies, tales como *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus uberis*, *Streptococcus dysgalactiae* y *Streptococcus zooepidemicus* han sido aislados de ubres caprinas (**LERONDELLE y POUTREL, 1984; BAXENDELL, 1985;**

DISCUSION

LEON y cols., 1985).

Esto contrasta con el ganado vacuno, donde la prevalencia de los *Streptococos spp.* es mucho más importante (WILSON y RICHARDS, 1980; BLOOD y RADOSTITS, 1992); aunque también en porcentajes importantes han sido hallados en el ganado caprino en determinadas áreas geográficas (EL-SERGANY y cols., 1982; THORNTON, 1983; ISMAIL y cols., 1984; LERONDELLE y POUTREL, 1984; SHOUMAN y cols., 1986).

Otras bacterias pueden aislarse de mastitis subclínicas, aunque en esta fase experimental no los hemos aislados sí pueden presentarse pero generalmente con prevalencias bajas tales como *Bacillus spp.* (RAEVORY y KOIRANEN, 1979; DELAMPRE y cols., 1984; KALOGRIDOU-VASSILIADOU, 1991), *Mycoplasma spp.* (BARILE y cols., 1979; THORNTON, 1983; LERONDELLE, 1984; EAST y cols., 1987; BLIKSLAGER y ANDERSON, 1992; CONTRERAS DE VERA y cols., 1992), *Corynebacterium spp.* (BRAMLEY y DODD, 1984; KALOGRIDOU-VASSILIADOU), hongos y levaduras (BAXENDELL, 1985; CONTRERAS DE VERA y cols., 1992).

Una forma especial de mastitis subclínica que se debe considerar es la irritación de la ubre o alteración de la secreción (mastitis aséptica). Cuya causa no se halla en la infección por bacterias, sino en la influencia de factores ambientales tales como golpes o presiones o bien ordeños equivocados y duraderos, etc. (MANSER, 1985; KLEINSCHROTH y cols., 1989).

1.2.- EVALUACION DEL CONTAJE CELULAR EN LA LECHE DEL GANADO CAPRINO

1.2.1.- VALORES CELULARES FISIOLÓGICOS

El contenido celular de la leche es un factor que ayuda a conocer el estado sanitario de la ubre. Un elevado contenido celular significa enfermedad de la ubre, menor producción de leche, alteración de su composición y consiguiente pérdida económica (DULIN y cols., 1983;

DISCUSION

KLEINSCHROTH y cols., 1989; CULLOR y cols., 1990; BLOOD y RADOSTTTS, 1992).

Las influencias nocivas sobre la ubre (ordeño erróneo, frío, golpes, etc.) o la infección ocasionan un aumento considerable y rápido del número de células de la leche, como consecuencia de la llegada de gran cantidad de células defensivas, principalmente leucocitos (**KLEINSCHROTH y cols., 1989; CULLOR y cols., 1990; BLOOD y RADOSTTTS, 1992).**

El grado de incremento celular se halla en relación directa con la gravedad del proceso que sufre la ubre, por lo que el examen del contenido celular de la leche puede indicar su estado funcional (**KLEINSCHROTH y cols., 1989; CULLOR y cols., 1990; BLOOD y RADOSTTTS, 1992).**

Los contajes de células somáticas se han aceptado como el mejor índice cuantitativo de la inflamación de la glándula mamaria bovina y se utiliza tanto para evaluar la calidad de la leche como para predecir el estado de infección de la ubre (**POUTREL y RAINARD, 1982; KLEINSCHRTOH y cols., 1989; CULLOR y cols., 1990; BLOOD y RADOSTTTS, 1992).**

La cuestión ha sido si los diversos métodos usados rutinariamente para estimar los contajes de células somáticas y el valor umbral reconocido como normal en vacas (500.000 células/ml) pudieran aplicarse con precisión para las determinaciones en la leche de cabra (**POUTREL y LERONDELLE, 1983; PARK y HUMPHREY, 1986**), lo cual ha sido motivo de controversia (**ATHERTON, 1983; PARK y HUMPHREY, 1986; CULLOR y cols., 1990).**

Diversos autores han indicado que el contaje de células somáticas en cabras no se correlaciona con el número de leucocitos (**SMITH y ROGUINSKY, 1977; HINCKLEY y WILLIAMS, 1981; SHELDRAKE y cols., 1981; DULIN y cols., 1982; HINCKLEY, 1983; PARK y HUMPHREY, 1986**), ésto es debido a la secreción de la leche de cabra que al ser de tipo apocrino resulta con un elevado número de partículas esféricas citoplásmicas y de células epiteliales (**WOODING y cols., 1970; SCHALM y cols., 1971; DULIN y cols., 1983; HINCKLEY, 1983).**

Los resultados obtenidos con el método directo de cuantificación celular en leche mediante *Fossomatic* en el grupo de animales sanos han oscilado a lo largo del periodo de lactación con unas medias aritméticas

DISCUSION

comprendidas entre $349'28 \times 10^3$ células/ml y $671'46 \times 10^3$ células/ml. Presentando unos valores medios en los estadios intermedios de $471'23 \times 10^3 \pm 489'58 \times 10^3$ células/ml (tabla II, gráfico 2). Estos resultados obtenidos con el *Fossomatic* coinciden estrechamente con los valores medios del conteo de células somáticas recogidas por otros autores (OKADA, 1960; NESBAKKEN, 1976; PEREZ y SCHULTZ, 1979; PETTERSEN, 1981; POUTREL y LERONDELLE, 1983; SIERRA y cols., 1992).

Atendiendo a los resultados de estos contajes celulares según los distintos lotes de animales según la edad (tablas III, IV, V y VI) hemos observado que existen diferencias estadísticas manifiestas entre los distintos grupos, diferencias que se han podido atribuir al grupo de 3 años ($p < 0'01$), en el cual se puede apreciar unos valores medios muchos más bajos que los observados en los restantes grupos.

Aunque los diversos investigadores no han considerado este factor edad en la interpretación de los resultados (POUTREL y LERONDELLE, 1983; KALOGRIDOU-VASSILIADOU y cols., 1992), debido a la gran variabilidad con que resultan los distintos contajes realizados en los animales, hemos considerado este factor como una posible variante de la diversidad de los valores, y con nuestros resultados y estudios estadísticos hemos podido apreciar que la edad es un factor que influye en el contenido celular de las ubres de los animales.

En todos los lotes de animales sanos se ha podido apreciar que los mayores registros observados del número de células en la leche coinciden con la etapa final de la lactación (tablas III, IV, V y VI). También en general, todos suelen comenzar con un número elevado de conteo celular que disminuye en el siguiente mes de lactación. Estos incrementos a medida que la lactación avanza en las medias de los contajes celulares se ha observado que tienen lugar tanto en la leche de bovinos como en la de caprinos (COLLINS y cols., 1982; LERONDELLE y POUTREL, 1984; MATTILA, 1985; MAISI, 1990a).

Al igual que los resultados observados en nuestros estudios, se ha observado que los contajes de células somáticas en la leche del ganado caprino muestra fluctuaciones durante la lactación, observándose los mayores aumentos tanto en la época del parto como en los estadios últimos de la lactación (PEREZ y SCHULTZ, 1979; HINCKLEY, 1982; MAISI, 1990a).

DISCUSION

Es por ello que se ha sugerido que los contajes celulares debían relacionarse con el estado de la lactación, y que hacia el final de la misma se podían alcanzar valores similares a los de las ubres infectadas con patógenos mayores (PEREZ y SCHULTZ, 1979).

El estudio del análisis de varianza de los contajes celulares realizados con este método *Fossomatic* a lo largo de la lactación no nos ha mostrado diferencias significativas si consideramos el colectivo en conjunto sin tener en cuenta las edades de los animales. Sin embargo, el análisis pormenorizado a lo largo del muestreo denota la presencia de un componente altamente significativo ($P < 0'01$) debido al factor edad.

Estos resultados están en concordancia con los estudios llevados a cabo por P. MAISI (1990a), en el cual al valorar los cambios fisiológicos en la leche caprina ante diversos parámetros inflamatorios observa que existen diferencias altamente significativas entre los distintos grupos de edades en los animales estudiados, siendo el grupo de animales más jóvenes los que mostraron los valores más bajos para cada parámetro analizado. Sin embargo, M. PEREZ y SCHULTZ (1979) indicaron que aunque los contajes de células somáticas en la leche de vaca presentaban niveles más elevados en los animales mayores no ocurría igual para la leche caprina, lo cual contrasta con nuestros estudios y los realizados por P. MAISI (1990a).

Los resultados de la cuantificación celular obtenidos con el método directo *Coulter-Counter* (tabla II) en el grupo de animales sanos se nos han presentado con unas medias aritméticas que han oscilado entre $860'32 \times 10^3$ células/ml y $1.341'99 \times 10^3$ células/ml a lo largo del periodo de la lactación. Estos valores coinciden con los resultados obtenidos por diversos autores (SHELDRAKE, 1981; POUTREL y cols., 1983; LERONDELLE y POUTREL, 1984).

Los contajes celulares registrados con el método *Coulter-Counter* (tablas III, IV, V y VI) al igual que ocurre con el *Fossomatic* nos ha mostrado diferencias significativas con respecto a la edad de los animales.

Otros autores no dan medias tan limitadas, ya que en sus estudios han hallado que los contajes celulares en la leche de cabra son extremadamente variables y generalmente mucho mayores que los contajes celulares obtenidos en la leche del ganado vacuno (SMITH y ROGUINSKY, 1977; PEREZ y

DISCUSION

SCHULTZ, 1979; GROOTENHUIS, 1980; HUNTER, 1984).

Así por ejemplo **M.C. SMITH y ROGUINSKY (1977)** establecieron la siguiente guía general para la interpretación de mastitis del ganado caprino: contajes inferiores a un millón de células por mililitro representan glándulas sanas o con una ligera irritación; de quinientas mil a dos millones de células por mililitro sugerían la presencia de microorganismos no patógenos o ligeramente patógenos; y contajes superiores a un millón y medio por mililitro son indicativos de la presencia de microorganismos patógenos, siendo los más frecuentes *Staphylococcus spp.*

Los contajes celulares en cabras se pueden presentar con valores muy variables que se han situado por debajo de 500.000 células por mililitro (19-47 % de las muestras) (**PEREZ y SCHULTZ, 1979; GROOTENHUIS, 1980; THORNTON, 1983; HUNTER, 1984**), entre 500.000 y 1.000.000 de células/ml (17-25 % de las muestras) (**PEREZ y SCHULTZ, 1979; GROOTENHUIS, 1980; THORNTON, 1983; HUNTER, 1984**) y entre 1.000.000 y 2.000.000 de células por mililitro (21-34 % de las muestras) (**PEREZ y SCHULTZ, 1979; GROOTENHUIS, 1980; THORNTON, 1983; HUNTER, 1984**). Estos distintos rangos de valores también lo hemos podido apreciar en nuestro estudio.

Debido a la gran variabilidad en los resultados de los contajes de células somáticas que se pueden presentar en la leche del ganado caprino es por lo que se considera importante el tener en cuenta los diversos factores que puedan influir en los mismos, ya sea edad de los animales, estado de lactación, así como considerar otros factores que han sido observados en otros estudios, en los cuales aprecian que pueden existir diferencias significativas cuando se comparan las medias de contajes celulares entre rebaños distintos (**NESBAKKEN, 1976; LERONDELLE y POUTREL, 1984; CAPUCO y cols., 1986**). Posiblemente esto sea debido a las diferentes medidas de manejo llevadas a cabo, condiciones sanitarias o estado de infección (**NESBAKKEN, 1976; LERONDELLE y POUTREL, 1984**). Sin embargo, dentro del mismo rebaño se ha observado que las variaciones son menos pronunciadas (**SHELDRAKE y cols., 1981; CAPUCO y cols., 1986**).

Los contajes celulares obtenidos con el método *Fossomatic* se han presentado bastante inferiores a los obtenidos con el método *Coulter-Counter* (**DULIN y cols., 1982; POUTREL y LERONDELLE, 1983**). Esto

DISCUSION

posiblemente sea debido a que las partículas citoplásmicas parecidas a las células que no son leucocitos y que comunmente se encuentran en la leche de cabra no contienen ADN, por lo que con este método al igual que los diversos métodos que son específicos para medir el ADN, dan resultados significativamente menores que los contajes electrónicos de partículas mediante *Coulter-Counter* o con los contajes de células somáticas con métodos directos al microscopio mediante técnicas de tinciones no específicas (DULIN y cols., 1982; DULIN y cols., 1983; KALOGRIDOU-VASSILIADOU y cols., 1992).

Debido a que el método *Coulter-Counter* no puede diferenciar entre las partículas citoplásmicas (las cuales están presentes en la leche de cabra) de los leucocitos, es por lo que con este método se obtienen elevados contajes celulares (DULIN y cols., 1982; POUTREL y LERONDELLE, 1983). Por esta razón diversos autores recomiendan que para estimar la concentración de células somáticas en la leche de cabra se deben de emplear sólo aquellos métodos que sean específicos para la determinación del ADN nuclear (MAISI, 1990a; KALOGRIDOU-VASSILIADOU y cols., 1992). No observándose diferencias entre los métodos que miden específicamente el ADN (DULIN y cols., 1982).

Aunque cabe esperar que el número de partículas citoplásmicas sea variable, nosotros hemos encontrado que aproximadamente los contajes obtenidos con el método *Coulter-Counter* han sido el doble a los obtenidos con el método *Fossomatic* para el grupo de animales sanos, y más variable, de dos a siete veces para animales con mastitis subclínica. Similares resultados han sido recogidos por otros autores (DULIN y cols., 1982; POUTREL y LERONDELLE, 1983).

Entre los contajes obtenidos con el método *Coulter-Counter* y el método *Fossomatic* hemos observado a lo largo de los distintos meses que comprendía la lactación una correlación positiva significativa ($P < 0'01$) durante todos los meses y en el sexto mes fue de $P < 0'001$. Y comparando ambos métodos sin considerar los distintos meses de la lactación encontramos igualmente una correlación positiva significativa ($P < 0'01$). Esta correlación significativamente positiva entre *Fossomatic* y *Coulter-Counter* también ha sido apreciada por otros investigadores (POUTREL y RAINARD, 1982; POUTREL y LERONDELLE, 1983). A pesar de todo, y debido fundamentalmente a la variabilidad de las desviaciones obtenidas en nuestra experiencia, esta conclusión positiva no tiene una importante significación

DISCUSION

estadística.

En el presente estudio, la distribución de los resultados al *California Mastitis Test* en la leche de cabras sanas varía ligeramente dependiendo del estado de lactación (tabla VII) y de las edades de los animales, variaciones que también han sido apreciadas por otros autores (MELLENBERGER, 1979; MAISI, 1990a), pues en nuestro estudio hemos obtenido que en el primer mes de lactación un 79'41 % de los animales mostraron una negatividad al mismo, y el 20'59 % restante ha presentado una positividad entre los niveles de reacción 1 y 2.

Esta positividad observada en el primer mes de lactación va disminuyendo en los meses intermedios, pero a medida que se van aproximando hacia el final del periodo de producción, se incrementa de nuevo el porcentaje de positividad, donde en el último mes de la lactación un 17'54 % de los animales mostraron niveles de positividad (a nivel de reacción 1 y 2) coincidiendo con otros autores (MELLENBERGER, 1979; MAISI, 1990a). Ahora bien estas variaciones que se pueden apreciar al observar las distintas curvas del *California Mastitis Test* al realizar los análisis de varianza no resultaron siempre significativas, sólo se apreciaron tales diferencias en el tercer, cuarto y quinto mes de la lactación, y se atribuyeron al grupo de animales más jóvenes ($P < 0'05$). Estos resultados son similares a los observados en otros estudios (MAISI, 1990a), apreciándose también que los animales más jóvenes suelen dar reacciones más bajas, lo cual coincide con los resultados observados anteriormente para las técnicas *Fossomatic* y *Coulter-Counter*.

Aunque el *California Mastitis Test* podría aplicarse en cualquier mes de la lactación, se ha recomendado que para una mayor fiabilidad de este test se debe aplicar a partir del tercer día después del parto y no utilizarlo una vez que el periodo de secado hubiese comenzado (SCHALM y NOORLANDER, 1957), ya que tanto las leches calostrales como las secreciones en el periodo de secado presentan un elevado contenido celular, y por lo tanto, pueden manifestar reacciones falsas positivas con esta técnica (SCHALM y NOORLANDER, 1957).

Diversos estudios han recogido que existe una buena correlación entre los niveles de lectura del *California Mastitis Test* y el conteo de células somáticas en la leche del ganado caprino (MELLENBERGER, 1979;

DISCUSION

PETTERSEN, 1981; COLLINS y cols., 1982). R. MELLEBERGER (1979) recogió que el 64 % de las muestras de leche (en los estadios intermedios de la lactación) mostraban una reacción negativa (niveles 1 y 2) al *California Mastitis Test*. En nuestro estudio hemos observado porcentajes más elevados entre un 80-90 % que mostraron reacciones negativas al test.

A pesar de que numerosos autores han comprobado que los contajes de células somáticas en la leche normal del ganado caprino presenta unos niveles mayores que los obtenidos en la leche de vacas (**CARUOLO, 1974; PAAPE y cols., 1977; GROOTENHUIS, 1980; LOWENSTEIN y cols., 1980; DULIN y cols., 1982**), sin embargo se ha indicado que los niveles de lectura con el *California Mastitis Test* que reflejan los contajes de neutrófilos en leche de cabra son similares a los encontrados en la leche del ganado bovino (**SCHALM y cols., 1971; POUTREL y LERONDELLE, 1983**). Esto es debido, a que el incremento que se produce con el *California Mastitis Test* normalmente es debido a una elevación en el número de neutrófilos y las estructuras citoplásmicas que están presentes en la leche de cabra no reaccionan con el reactivo de dicha prueba (**SCHALM y cols., 1971; DULIN y cols., 1982; THORNTON, 1983**).

Algunos autores han sugerido que los niveles de lectura 1, 2 y 3 del *California Mastitis Test* deben considerarse como normales en la leche de cabras en los estadios intermedios de la lactación (**PETTERSEN, 1981**), y que las reacciones cuarta y quinta son las realmente importantes en el ganado caprino, ya que la leche normal de cabra puede dar reacciones del nivel segundo y tercero (**SMITH y ROGUINSKY, 1977; AVILA y cols., 1982**). Aunque nosotros estaríamos más de acuerdo con aquellos autores que consideran que el umbral del *California Mastitis Test* a partir de cuatro es indicativo de infección, y el nivel tres se debe considerar sospechoso de presentar infección (**MAISI, 1990b, MAISI y RIIPINEN, 1991**).

En nuestro estudio hemos podido observar que un bajo nivel de lectura al *California Mastitis Test* suele ser un buen indicador de la ausencia de infección en la glándula mamaria (**AVILA y cols., 1982; MAISI, 1990b**). Sin embargo, un elevado nivel de reacción a esta prueba no siempre es indicativo de infección, al igual que ha sido observado en otros estudios (**AVILA y cols., 1982**).

El *California Mastitis Test* ha sido uno de los métodos indirectos más

DISCUSION

ampliamente utilizado para propósitos rutinarios en el laboratorio así como en condiciones de campo tanto en el ganado vacuno (DODD, 1983; KLEINSCHROTH y cols., 1989; CULLOR y cols., 1990; BLOOD y RADOSTITS, 1992), ovino (DODD, 1983; CULLOR y cols., 1990) como en el ganado caprino (SMITH y ROGUINSKY, 1977; POUTREL, 1984; BAXENDELL, 1985; MANSER, 1985, CRIPPS, 1986; MAISI, 1990b; MAISI y RIIPINEN, 1991). A pesar de ello, al ser el *California Mastitis Test* un método subjetivo presenta las limitaciones propias de dicho carácter (PETTERSEN, 1981).

1.2.2.- VALORES CELULARES EN LECHE DE CABRA CON MASTITIS SUBCLINICA

El número de microorganismos patógenos presentes en la leche puede ser un índice cuantitativo de inflamación de la glándula mamaria (KAPTURE, 1980; POUTREL y LERONDELLE, 1983; PARK y HUMPHREY, 1986). Es por ello que algunos autores consideran que se debe comparar o correlacionar el contaje de células somáticas con el número de bacterias presentes en la leche (POUTREL y LERONDELLE, 1983; PARK y HUMPHREY, 1986).

La influencia de las infecciones de la ubre debidas a estafilococos coagulasa negativos sobre los contajes totales de células somáticas en la leche del ganado caprino ha sido una cuestión ampliamente debatida (ROGUINSKY y cols., 1971; HOLMBERG, 1973; SMITH y ROGUINSKY, 1977; MAISI y RIIPINEN, 1991; KALOGRIDOU-VASSILIADOU y cols., 1992).

Esta controversia es debida a que algunos autores recogen la presentación de un incremento del contaje de células somáticas en ubres que albergan estafilococos coagulasa-negativos (ROGUINSKY y cols., 1971; HOLMBERG, 1973; SMITH y ROGUINSKY, 1977; DULIN y cols., 1983; POUTREL y LERONDELLE, 1983), y sin embargo otros autores no hallaron diferencias entre las ubres infectadas y ubres libres de infección (PEREZ y SCHULTZ, 1979; PETTERSEN, 1981; SHELDRAKE y cols., 1981).

Por todo ello se ha indicado que se deben separar los estándares establecidos para la leche de vaca de los de cabra (INTERNATIONAL

DISCUSION

DAIRY FEDERATION, 1979; ATHERTON, 1983; PARK y HUMPHREY, 1986). Y aunque existan problemas de coste y viabilidad en la situación práctica de las ganaderías, es recomendable realizar la determinación de leucocitos para detectar las condiciones anormales en las leches del ganado caprino (ATHERTON, 1983; PARK y HUMPHREY, 1986).

En el presente estudio los animales que presentaron mastitis subclínicas mostraron contajes celulares elevados a lo largo de toda la duración de la lactación determinados tanto con la técnica *Fossomatic* ($P < 0'001$) (tabla XII, gráfico 22), como con el método *Coulter-Counter* ($P < 0'001$) (tabla XII, gráfico 22). Estos incrementos son observados en los diversos estudios que han aplicado los diversos métodos de cuantificación celular (ROGUINSKY y cols., 1971; HOLMBERG, 1973; SMITH y ROGUINSKY, 1977; DULIN y cols., 1983; POUTREL y LERONDELLE, 1983; KALOGRIDOU-VASSILIADOU y cols., 1992). La cuestión ha sido que si tales incrementos se producen sólo por patógenos mayores o también por los patógenos menores.

Nuestros resultados apoyan a los de aquellos autores que recogen un incremento del contaje de células somáticas en ubres que albergan estafilococos coagulasa-negativos, incrementos que han sido significativos determinados tanto con el método *Fossomatic* ($P < 0'001$) como con el método *Coulter-Counter* ($P < 0'001$) (ROGUINSKY y cols., 1971; HOLMBERG, 1973; SMITH y ROGUINSKY, 1977; DULIN y cols., 1983; POUTREL y LERONDELLE, 1983; KALOGRIDOU-VASSILIADOU y cols., 1992).

Los resultados de algunos estudios han mostrado que los contajes con el método *Fossomatic* cuando se exceden de 1.000.000 de células por mililitro detecta entre un 72-80 p. 100 de infecciones por patógenos mayores (POUTREL y LERONDELLE, 1983; KALOGRIDOU-VASSILIADOU, 1992), siendo la detección de patógenos menores más pequeña, entre un 18 y 45 p. 100 (POUTREL y LERONDELLE, 1983; KALOGRIDOU-VASSILIADOU, 1992).

En nuestro estudio al tomar como referencia este nivel de un millón de células para el *Fossomatic* obtenemos resultados muy similares con respecto a la detección de patógenos mayores (86'96 %), sin embargo para la detección de patógenos menores (comprendiendo éstos a los estafilococos

DISCUSION

coagulasa-negativos) hemos obtenidos porcentajes bastantes superiores (81'43 %) a los obtenidos en otros estudios (POUTREL y LERONDELLE, 1983; KALOGRIDOU-VASSILIADOU, 1992).

Esto podría explicarse al distinto grado de patogenicidad que puede presentarse en las distintas especies de estafilococos coagulasa-negativos, como ha quedado demostrado en el estudio llevado a cabo por P. MAISI y RIIPINEN (1991) en el que apreciaron que numerosas especies de estafilococos coagulasa-negativos que se aíslan de casos de mastitis subclínicas presentan una patogenicidad intermedia, produciendo por lo tanto incrementos significativos en los contajes de células somáticas en la leche del ganado caprino.

En estudios realizados en el ganado caprino, se ha obtenido que el umbral de mayor discriminación determinado con el método *Coulter-Counter* para el diagnóstico de ubres infectadas era de 1.000.000 de células por mililitro (LERONDELLE y POUTREL, 1984). Usando este valor, el 72 p. 100 de infecciones producidas por patógenos mayores fueron diagnosticadas y sólo un 18 p. 100 de infecciones producidas por estafilococos coagulasa-negativos (LERONDELLE y POUTREL, 1984). Sin embargo nuestros resultados nos muestran tomando como nivel de discriminación 1.000.000 de células por mililitro una detección de microorganismos más elevada, un 99 p. 100 de los patógenos mayores y un 96 p. 100 de los patógenos menores, lo cual podría explicarse como anteriormente visto en el método *Fossomatic* a la diferencia del grado de patogenicidad de los microorganismos que intervienen en estas mastitis subclínicas.

Estos autores aunque no detectan el 19 p. 100 de las infecciones por patógenos mayores, consideran que ese umbral de 1.000.000 de células por mililitro no es demasiado malo para el diagnóstico de las mastitis subclínicas si se comparan con resultados obtenidos para vacas con un umbral de 500.000 células por mililitro (LERONDELLE y POUTREL, 1984). Sin embargo, en el periodo de secado, aunque el 90 p. 100 de las infecciones por patógenos mayores fueron diagnosticadas, aproximadamente un 60 p. 100 de ubres no infectadas fueron consideradas como infectadas, debido a que en este periodo los contajes celulares son muy elevados (LERONDELLE y POUTREL, 1984).

Con este umbral de discriminación de 1×10^6 células por mililitro los

DISCUSION

valores de sensibilidad y especificidad de esta técnica en nuestro caso varían sustancialmente situándose, respectivamente, en 96 p. 100 y 61 p. 100.

Aunque en diversos estudios se asocia a los estafilococos coagulasa-negativos con aumentos relativos de los contajes celulares en leche (PETTERSEN, 1981; SHELDRAKE y cols., 1981; LERONDELLE y POUTREL, 1984), también se ha observado que algunos rebaños con infecciones debidas a *Staphylococcus aureus* se han asociado con contajes celulares relativamente limitados ($1,44 \times 10^6$ células/ml), lo cual es debido a las propiedades patogénicas particulares de las cepas presentes en tales rebaños (LERONDELLE y POUTREL, 1984).

En el estudio de la distribución de los resultados al *California Mastitis Test* (tabla XIII) en este grupo de animales con mastitis subclínicas aunque en muchas de estas infecciones se produjeron un aumento en los niveles de la prueba, no en todos los casos se obtuvieron reacciones positivas, presentándose reacciones negativas a lo largo de los meses de la lactación. Por lo que con estos resultados observamos que tanto el nivel dos como el tres se pueden presentar tanto en animales sanos como en animales con mastitis subclínica, por lo que estos niveles del *California Mastitis Test* aunque no siempre son indicativos de la presencia de infección pueden considerarse como sospechosas de mastitis subclínicas. Estas variaciones pueden ser debidas tanto a la subjetividad del test, como al grado de patogenicidad de los microorganismos que albergan en la ubre del animal (HOLMBERG, 1973; PETTERSEN, 1981; AVILA y cols., 1982).

Así como observávamos que en las ubres sanas tras el periodo calostrual los niveles del *California Mastitis Test* declinan a niveles menores dentro de las primeras semanas de la lactación, en las ubres infectadas estos niveles permanecen elevados, al igual que lo observado en otros estudios (AVILA y cols., 1982; THORNTON, 1983; MAISI, 1990a, MAISI, 1990b).

P. MAISI (1990a) observó en su estudio diferencias altamente significativas entre los niveles del *California Mastitis Test* de ubres sanas y ubres caprinas infectadas subclínicamente. Sin embargo en nuestro estudio hemos observado diferencias pero que no son tan significativas, lo cual podría deberse al caracter subjetivo de la prueba y al diverso grado de patogenicidad de los microorganismos.

DISCUSION

Si incrementamos los coeficientes de positividad que señalamos en el capítulo III.2 para esta técnica en el sentido de considerar con mastitis subclínicas aquellas muestras con lecturas de positividad superiores al cuarto nivel (positiva ++), los valores de sensibilidad y especificidad obtenidos en nuestro caso se sitúan, respectivamente, en 41 p. 100 y 97 p. 100.

En los diversos estudios llevados a cabo para valorar la cuestionada patogenicidad de las infecciones por estafilococos coagulasa-negativos se ha observado que la mayoría de estas infecciones producen aumentos significativos a la lectura de reacción del *California Mastitis Test* (POUTREL y LERONDELL, 1983; HINCKLEY y cols., 1985; MAISI, 1990b; MAISI y RIIPINEN, 1991; KALOGRIDOU-VASSILIADOU y cols., 1992), incrementos que también han sido observados en nuestro estudio.

Como hemos podido observar de los diversos resultados de nuestra investigación, los estafilococos coagulasa-negativos producen incrementos celulares significativos ($P < 0'001$) detectados tanto con los métodos *Fossomatic*, *Coulter-Counter* como en los niveles de reacción del *California Mastitis Test* ($P < 0'05$), resultados que apoyan a los de aquellos autores que indican que estos microorganismos que producen disminución de la producción de leche, persisten a lo largo de la lactación, pueden persistir de una lactación a otra y además aumentan aquellos parámetros indicativos de inflamación de la ubre, son patógenos genuinos de las ubres caprinas (POUTREL y LERONDELLE, 1983; HINCKLEY y cols., 1985; MAISI, 1990b; MAISI y RIIPINEN, 1991; KALOGRIDOU-VASSILIADOU y cols., 1992).

Los resultados de los diversos estudios llevados a cabo apoyan el punto de vista de que las infecciones de la ubre con patógenos, y en numerosas ocasiones con microorganismos generalmente considerados como de baja patogenicidad, son la principal causa del aumento de los niveles de los contajes celulares en la leche (PEREZ y SCHULTZ, 1979; GROOTENHUIS, 1980; HUNTER, 1984; LERONDELLE y POUTREL, 1984; MAISI y RIIPINEN, 1991).

Una importante observación que emerge del presente estudio es referente a la persistencia de las infecciones subclínicas a lo largo de la lactación. En nuestro estudio hemos observado que un 72'73 % de las infecciones diagnosticadas al inicio de la lactación todavía estaban presentes

DISCUSION

al final de la misma, similares resultados se han apreciado en otros estudios (**LERONDELLE y POUTREL, 1984, MAISI, 1990b**). Las infecciones por estafilococos coagulasa-negativos persistieron a lo largo de la lactación así como las infecciones por patógenos mayores, esta misma tendencia también se ha observado en infecciones de la glándula mamaria de los bovinos (**RAINARD y POUTREL, 1982**).

Muchas de estas infecciones persisten en el periodo de secado hasta la siguiente lactación (**NESBAKKEN, 1978; LERONDELLE y POUTREL, 1984; POUTREL, 1984; EAST y cols., 1987**), además en este periodo también se ha observado que se produce nuevas infecciones en la ubre en una proporción que es el doble a las que tiene lugar en el periodo de lactación (**LERONDELLE y POUTREL, 1984**). Estos datos justifican el uso de procedimientos de control de las mastitis tales como desinfección del canal del pezón tras el ordeño, y tratamientos en el periodo de secado en rebaños problemas (**PLOMMET, 1974**).

V.2.- EXPERIENCIA II.

La función inmunológica de las secreciones mamarias está relacionada tanto con el suministro de protección a las crías como con la protección de la propia glándula mamaria contra los patógenos de la ubre (GUIDRY y cols., 1980; OLSON y cols., 1981; CAFFIN y POUTREL, 1988; CULLOR y cols., 1991; BENDA, 1993).

La concentración de inmunoglobulinas en la leche parecen ser insuficientes para esta última función (NORCROSS y STARK, 1970; NORCROSS, 1977; CAFFIN y POUTREL, 1988). Es por ello que diversos estudios se han dirigido para incrementar las defensas mamarias (NORCROSS, 1977; CRAVEN y WILLIAMS, 1985).

Aunque existen numerosos estudios acerca de las concentraciones relativas de inmunoglobulinas en la sangre y secreciones mamarias de los rumiantes, fundamentalmente en bovinos y ovinos (BRANDON y cols., 1971; PORTER, 1972; WATSON y cols., 1972; WILSON y cols., 1972; ZIV y GORDON, 1973; BRANDON y LASCELLES, 1975), estos estudios se han centrado principalmente en la caracterización de la dinámica de concentración durante la formación de los calostros y al inicio de la lactación en relación a la protección de las crías, pero han sido pocos los estudios que se han llevado a cabo relativos al contenido de inmunoglobulinas en la leche a lo largo del ciclo de la lactación (GUIDRY y cols., 1980; CAFFIN y cols., 1983; CAFFIN y POUTREL, 1988).

A estos efectos debemos destacar la escasa bibliografía disponible hasta la fecha con la que contrastar los resultados de nuestra experiencia.

2.1.- CONCENTRACION DE IgG EN LECHE DE CABRAS SANAS

Existe una gran variación en la concentración de las inmunoglobulinas en los fluidos lácteos de secreciones de la glándula no lactante y calostros y a través de los diversos estados de la lactación (NORCROSS, 1977). La

DISCUSION

dinámica de los cambios de las concentraciones de IgG (gráficos 25 y 26) en la leche tras el momento del parto se nos han mostrado similares a los de otros estudios en rumiantes (BUTLER y cols., 1972; PORTER, 1972; WATSON y cols., 1972; BUTLER, 1974; GUIDRY y MILLER, 1986).

La concentración de IgG (tabla XVIII, gráficos 25 y 26) presentes en la leche en el lote de animales sanos se nos ha presentado con los niveles más elevados en el primer día de la lactación ($10'89 \pm 2'19$ mg/ml), coincidiendo con la secreción de los calostros (SMITH y cols., 1972; CULLOR y cols., 1990). En los rumiantes no se produce transferencia transplacentar de inmunoglobulinas hacia el feto. Toda transferencia de inmunoglobulinas a las crías es pasiva y tiene lugar inmediatamente tras el parto (BUTLER, 1974; GUIDRY y cols., 1980). Es por ello que la composición de inmunoglobulinas en las secreciones lácteas de los rumiantes es muy elevada durante este periodo (BUTLER, 1974; GUIDRY y cols., 1980; GUIDRY y MILLER, 1986).

Se ha observado en diversos estudios que la concentración total de las inmunoglobulinas en los calostros de los bovinos tiene unos valores medios de 50 mg/ml (JANOTA-BASSALIK y cols., 1975; NORCROSS, 1977), de los cuales aproximadamente el 80-90 % corresponden a IgG, el 7 % a IgM y un 5 % a IgA, por lo cual se ha observado que los calostros bovinos suelen contener aproximadamente unos 40 mg/ml de IgG (NORCROSS, 1977; GUIDRY y MILLER, 1986). Sin embargo, nosotros hemos obtenidos niveles muchos más bajos ($10'89 \pm 2'19$ mg/ml), aunque estas diferencias pueden ser debidas a los diversos factores que pueden influir en las variaciones de las concentraciones de las inmunoglobulinas tanto en el plasma como en la leche y que incluyen aparte de la diferencia de especie, la edad de los animales (WILLIAMS y cols., 1975; WILLIAMS y MILLAR, 1979; DEVERY-POCIUS y LARSON, 1983), la raza (HALLIDAY y cols., 1978; WILLIAMS y MILLAR, 1979), la dieta (WILLIAMS y MILLAR, 1979; OLSON y cols., 1981) y el estado fisiológico de la lactación (CIUPERCESCU, 1977; NORCROSS, 1977; CAFFIN y cols., 1983; CAFFIN y POUTREL, 1988).

Rápidamente se producen cambios durante la primera semana postparto (tabla XVIII, gráficos 25 y 26), ya que se observa que las inmunoglobulinas disminuyen rápidamente durante este periodo que en nuestro estudio ha sido aproximadamente a la mitad de las concentraciones iniciales. En otros estudios se observan que estos cambios tienen lugar con los

DISCUSION

distintos isotipos de inmunoglobulinas (IgG₁, IgG₂, IgA e IgM), donde disminuyen rápidamente tras el momento del parto (BUTLER, 1974; GUIDRY y cols., 1980; GUIDRY y MILLER, 1986). Ahora bien, en el vacuno esta disminución se produce de un modo mucho más acentuado ya que se ha observado unas concentraciones de IgG a la semana y media con unos valores medios de $3 \pm 1'83$ mg/ml (GUIDRY y MILLER, 1986), y en esta especie como veíamos anteriormente contienen niveles muy elevados de IgG en los calostros, y en cambio en nuestros resultados hemos obtenido a la semana y media unos valores medios para la IgG de $4'34 \pm 1'21$ mg/ml, por lo que la disminución observada en nuestro caso se produce más gradualmente.

En nuestro estudio se observa un descenso gradual de la IgG hasta el primer mes o mes y medio tras el parto y luego se mantiene dentro de unos límites más o menos constantes en los meses intermedios de la lactación con unos niveles medios entre 2 y 3 mg/ml. Estos cambios son similares a los observados en el vacuno, donde en algunos estudios se ha comprobado que las concentraciones de inmunoglobulinas van descendiendo hasta sus niveles más bajos tras los treinta días del parto, manteniéndose con unos niveles medios en los meses intermedios de la lactación entre 0'40 y 2 mg/ml, niveles que son generalmente inferiores a los que hemos observado en el presente estudio (GUIDRY y cols., 1980; CAFFIN y cols., 1983; GUIDRY y MILLER, 1986; CAFFIN y POUTREL, 1988).

En diversos trabajos se ha observado que se produce un incremento de las concentraciones de inmunoglobulinas hacia el final de la lactación. Tal fenómeno podría deberse a la constante producción del nivel de inmunoglobulinas mientras se produce una disminución de leche (GUIDRY y cols., 1980; CAFFIN y cols., 1983, GUIDRY y MILLER, 1986). Tal incremento no lo hemos observado posiblemente a que los animales no se hallaban en su etapa final de la lactación y por lo tanto no habíamos disminuido aún su producción de leche.

2.2.- CONCENTRACION DE IgG EN LECHE DE CABRAS CON MASTITIS SUBCLINICAS

Considerando las diversas clases de inmunoglobulinas, existe un

DISCUSION

proceso selectivo el cual es efectivo en favor del transporte del sistema humoral de una subclase de inmunoglobulina (IgG₁) sobre las otras (IgG₂, IgM, IgA) (SMITH y cols., 1972; WATSON y cols., 1972; NORCROSS, 1977; CAFFIN y POUTREL, 1988; CULLOR y cols., 1990).

Resultando pues, que la principal inmunoglobulina secretada de la glándula mamaria del vacuno y posiblemente de todos los rumiantes es la IgG₁ (GUIDRY y cols., 1980; CAFFIN y cols., 1983, GUIDRY y MILLER, 1986). La acción notable de este proceso selectivo resulta con calostros enormemente ricos en IgG₁, una clase de inmunoglobulina que tiene funciones protectoras importantes contra enfermedades infecciosas (GUIDRY y cols., 1980; CAFFIN y cols., 1983, GUIDRY y MILLER, 1986).

Los resultados obtenidos (tabla XIX y gráfico 27) de la medición de los niveles de IgG en la leche de cabras que presentaron mastitis subclínica oscilaron con unos valores medios entre 1'33 y 3'26 mg/ml. Al comparar estos resultados de la concentración de IgG en la leche con los obtenidos en el lote de cabras sanas (tabla XVIII), aunque presentan ligeras variaciones entre unas y otras éstas no son diferencias significativas.

Sin embargo, la penetración de bacterias en el interior de la glándula mamaria induce una reacción inflamatoria que produce una modificación de la leche (ASHWORTH y cols., 1967; FOX y cols., 1981; CAFFIN y cols., 1983). Es por ello importante el observar las variaciones que provocan los distintos patógenos de la ubre.

Al comparar la concentración de IgG (gráfico 30) en leche entre el grupo de cabras sanas con el grupo de cabras con mastitis subclínica teniendo en cuenta las distintas especies aisladas, podemos observar que existen diferencias notables a la comparación realizada entre el grupo de animales sanos (gráfico 28) con el de mastitis subclínica sin diferenciar las especies.

De este modo el grupo de cabras que presentaron mastitis subclínica debidas a estafilococos coagulasa-negativos (gráfico 30) presentó durante todos los meses que se realizaron controles a lo largo de la lactación niveles de la concentración de esta inmunoglobulina por debajo a los obtenidos en el grupo de animales sanos. No ocurriendo lo mismo para las mastitis subclínicas producidas por el resto de las especies bacterianas aisladas (micoplasmas, enterobacterias y *Bacillus spp.*), en los cuales se observan

DISCUSION

incrementos de IgG (gráfico 30), aunque en estos casos nos resulta difícil evaluar estos resultados por las pocas muestras analizadas que presentaron infección subclínica por estas etiologías. Sin embargo en el estudio llevado a cabo sobre la dinámica de las concentraciones de inmunoglobulinas a lo largo de la lactación por A. J. GUIDRY y cols. (1980) aislaron en una ocasión de un caso clínico de mastitis *Escherichia coli* en vacuno, no observando ninguna afectación a las inmunoglobulinas de la leche.

En cambio en otros estudios en el ganado bovino, se ha observado que los *Staphylococcus aureus* producen incrementos de IgG₁ en esas mamas infectadas, incrementos que se ha sugerido pueden ser debidos al proceso inflamatorio (CAFFIN y cols., 1983). Aunque nosotros no aislamos esta especie en el grupo de animales con mastitis subclínica, estos resultados están en concordancia con los nuestros, ya que hemos observado incrementos en especies patógenas como los micoplasmas, enterobacterias y *Bacillus spp.*. Y aquellas mamas que albergaban patógenos menores mostraban menos incrementos de IgG₁ (CAFFIN y cols., 1983), aunque estos autores apenas observan modificaciones de los estafilococos coagulasa-negativos, nosotros lo que hemos apreciado es que estos microorganismos incluso presenta niveles más bajo que en animales sanos.

Aunque en nuestro estudio no hemos aislado estreptococos, se ha observado que estos microorganismos no producían modificaciones de las concentraciones de IgG₁ en las mamas infectadas (CAFFIN y cols., 1983).

Al comparar la curva (gráfico 31) que describe el conteo celular con *Fossomatic* o con *Coulter-Counter* con la curva (gráfico 27) obtenida de la medición de los niveles de IgG en este grupo de animales con mastitis subclínica no se observa que exista una correlación, pues aunque en el segundo mes coincida un pico en la curva de IgG con un aumento celular con el *Coulter-Counter*, en el siguiente mes en el cual también se produce un aumento celular, los niveles de IgG sin embargo disminuyen. En el estudio llevado a cabo por J. P. CAFFIN y cols. (1983) determinaron el conteo de células somáticas para predecir la probabilidad de infección en los cuarterones de ubres bovinas, y al compararlos con los niveles de IgG₁ en la leche no observaron correlación entre ambos parámetros en cuarterones libres de infección. Este coeficiente de correlación no se modificaba significativamente por patógenos menores y estreptococos pero se incrementaba por la presencia de *Staphylococcus aureus*.

DISCUSION

Sin embargo, en el estudio realizado por **A. J. GUIDRY y MILLER (1986)** en el ganado bovino se obtiene que los cuarterones con contajes celulares por encima de 1×10^6 células por mililitro tenían mayores concentraciones de IgG_1 y de IgG_2 , pero no observaron diferencias cuando utilizaban como dintel 400.000 células por mililitro. Tal aseveración contrasta con nuestros resultados, ya que nosotros observamos incrementos celulares con infecciones debidas a estafilococos coagulasa-negativos y sin embargo no se producen incrementos de los niveles de IgG en leche con presencia de estos microorganismos, tal vez estas diferencias pueden ser debidas a que los estafilococos coagulasa negativos resultan más patógenos en las ubres caprinas que las observadas en las ubres bovinas.

VI.- CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

- 1.- Los valores celulares fisiológicos en leche de la Agrupación Caprina Canaria oscilan durante una lactación entre $349'28 \times 10^3$ y $671'46 \times 10^3$ células/ml para la técnica *Fossomatic* y $860'32 \times 10^3$ y $1.341'99 \times 10^3$ células/ml mediante la técnica *Coulter-Counter*.
- 2.- La edad y la fase de lactación se comportan como factores determinantes en estos valores celulares incrementándolos conforme aumentan los años de los animales y tanto al inicio como al final de la lactación para el método *Coulter-Counter*, y a medida que avanza dicho periodo para la técnica *Fossomatic*.
- 3.- La técnica de mayor sensibilidad ha sido la mostrada por el *Fossomatic* (85%), y en cuanto a la especificidad, todas ellas, tanto el *California Mastitis test*, *Fossomatic* y *Coulter-Counter*, han mostrado niveles muy similares, variando entre el 86 y el 89 p. 100.
- 4.- Con los parámetros por nosotros utilizados para las distintas técnicas hemos apreciado incrementos estadísticamente significativos en el reconocimiento de mastitis subclínica en el ganado caprino tanto con los métodos *Fossomatic* ($P < 0'001$), *Coulter-Counter* ($P < 0'001$), como con el *California Mastitis Test* ($P < 0'05$).
- 5.- En nuestra área geográfica las especies de estafilococos coagulasa-negativos implicadas en las mastitis subclínicas en el ganado caprino producen incrementos estadísticamente significativos en los valores celulares de la leche con las tres técnicas empleadas.
- 6.- La concentración de IgG en leche de cabras de la Agrupación Caprina Canaria exentas de infecciones en las ubres medida mediante la técnica de inmunodifusión radial, muestra su nivel medio más elevado el primer día de la lactación ($10'89$ mg/ml), para situarse el sexto mes de lactación en unos niveles medios de $2'42$ mg/ml.

CONCLUSIONES

7.- Si bien estas mismas concentraciones de IgG medidas mediante la misma técnica en ganado caprino con mastitis subclínica sin atender a la etiología de la infección, muestra en su conjunto valores más bajos que en animales exentos de infección, estas diferencias no se muestran estadísticamente significativas.

8.- Los estafilococos coagulasa-negativos producen depleciones en las concentraciones de IgG en leche que no son estadísticamente significativos respecto a los valores que muestran los animales exentos de infección de las ubres.

9.- La cuantificación de los niveles de IgG en leche de cabra mediante la técnica de inmunodifusión radial no se comporta como un método alternativo útil para el diagnóstico de las mastitis subclínicas en general.

VII.- RESUMEN

RESUMEN

Se han llevado a cabo dos experiencias, en la primera de ellas hemos empleado un total de 75 animales los cuales comprendían cuatro lotes de edad, siendo un lote de 3 años y otro de 4 con 18 animales cada uno, un lote de 6 y 7 años con un total de 33 animales y el lote mayor lo comprendía animales con 8 y 9 años con un total de 16 cabras. En esta primera experiencia los valores celulares fisiológicos y patológicos presentes en la leche de la Agrupación Caprina Canaria han sido determinados con los métodos *Fossomatic*, *Coulter-Counter* y *California Mastitis Test*, apreciándose que influyen sobre los mismos factores tales como la edad de los animales y el estado de lactación en el cual se encontraban, lo cual se demostró estadísticamente.

Los resultados obtenidos con el método *Fossomatic* en animales sanos han oscilado a lo largo del periodo de la lactación con unos valores medios entre $349'28 \times 10^3$ células/ml y $671'46 \times 10^3$ células/ml. Los valores medios obtenidos con el método *Coulter-Counter* en el grupo de animales sanos han oscilado entre $860'32 \times 10^3$ células/ml y $1.341'99 \times 10^3$ células/ml, apreciándose con ambas técnicas los valores más bajos en el lote de animales de menor edad. En todos los lotes los registros mayores se produjeron tanto en el inicio como al final de la lactación. Al comparar la distribución de los resultados al *California Mastitis Test* entre los distintos lotes de animales sanos, se observa que el lote de animales más joven es el que presenta un mayor porcentaje de negatividad a la lectura de la reacción.

La técnica de mayor sensibilidad ha sido la mostrada por el *Fossomatic* (85%), y en cuanto a la especificidad, todas ellas, tanto el *California Mastitis Test*, *Fossomatic* y *Coulter-Counter*, han mostrado niveles muy similares, variando entre el 86 y el 89 p. 100.

En la segunda experiencia seleccionamos dos lotes de animales, el primero constituido por 8 cabras sanas, y el segundo lo formaban 12 cabras que presentaban mastitis subclínica. Los valores medios de la concentración de IgG en la leche han sido determinados con la técnica de inmunodifusión radial tanto en animales sanos, considerando su estado de lactación, como en animales con mastitis subclínicas. En el grupo de animales sanos los valores medios de IgG al inicio de la lactación han sido de 10'89 mg/ml y en los estadios intermedios con valores entre 2'43 y 3'25 mg/ml.

RESUMEN

Los valores de IgG en animales con mastitis subclínicas fueron, en su conjunto, inferiores a los demostrados por los animales exentos de infección de la ubre. Estadísticamente estas variaciones no han sido significativas para las infecciones por estafilococos coagulasa-negativos. Esta técnica no ha demostrado su utilidad como prueba alternativa de diagnóstico de las mastitis subclínicas.

VIII.- SUMMARY

SUMMARY

In this work two different studies have been performed. In the first one 75 dairy goats have been employed taking into account age of studied animals, and grouped in four batches (3, 4, 6-7, 8-9 year-old respectively). In this study cell counts using *Fossomatic*, *Coulter-Counter* and *California Mastitis Test* were performed on "Agrupación Caprina Canaria", the milk samples were taken at monthly intervals through lactation period, the cell count was related to the stage of lactation and age animals in healthy goats.

The mean cell count of milk samples from goats with uninfected udders taken through lactation were between $349'28 \times 10^3$ cells/ml and $671'46 \times 10^3$ cell/ml using *Fossomatic* method. The mean cell count of milk samples from goats with uninfected udders were $860'32 \times 10^3$ cells/ml and $1.341'99 \times 10^3$ cells/ml using the *Coulter-Counter*. These estimates are lower in youngest animals with both methods. We found the concentration of cell counts to be greater during the first month of lactation, reduced during mid lactation and increased towards the end in all animals groups. *California Mastitis Test* showed lowest values in youngest animals.

Fossomatic method has better sensitivity value (85%) compared to *Coulter-Counter* and *California Mastitis Test*. *Fossomatic*, *Coulter-Counter* and *California Mastitis Test* have showed specificity values very similar, between 86 and 89 p. 100.

In the second study we worked with two animals batches, one of them were 8 goats with uninfected udders and a second group were 12 goats with subclinic mastitis. Goat milk IgG concentration was determined by radial immunodiffusion method in both groups. We considered the stage of lactation and mammary infection. Immunoglobulin G concentration in milk from goats with uninfected udders was highest at the beginning of lactation ($10'89$ mg/ml) and was lower in midlactation ($2'43-3'25$ mg/ml).

Udders with subclinic mastitis decreased IgG concentration in milk compared with goats with uninfected udders. Concentrations of IgG in milk were not significantly different between the two groups. These results have showed that radial immunodiffusion method is not good for subclinic mastitis diagnostic.

IX.- BIBLIOGRAFIA

BIBLIOGRAFIA

- ADAMS, D. (1982):** Molecules, membranes, and macrophages activation. *Immunol. Today*, **3**: 285.
- ADAMS, E.W., RICKARD, G.C. (1963):** The antistreptococcal activity of bovine teat canal keratin. *Am. J. Vet. Res.*, **24**: 122.
- ADAMS, S. (1980):** CAE virus suspected in high somatic cell counts. *Dairy Goat Guide*, **8**: 9.
- ADLAM, C., WARD, P.D., McCARTNEY, A.C. (1977):** Effect of immunization with highly purified alpha- and beta- toxins on staphylococcal mastitis in rabbits. *Infect. Immun.*, **17**: 250-256.
- ADLER, H.E., BROOKS, D.L. (1982):** *Mycoplasma* infections-the cause of arthritis, mastitis, and pneumonia of dairy goats in the United States. En *Proceed. 3rd Int. Conf. Goat Prod. Dis.*: 212-216.
- AHLSTEDT, S., CARLSSON, B., HANSON, L.A., GOLDBUM, R.M. (1975):** Antibody production by human colostrum cells. I. Immunoglobulin class, specificity and quantity. *Scand. J. Immunol.*, **4**: 535-539.
- ANDERSON, J.C. (1978a):** Absence of bacterial adherence in the establishment of experimental mastitis in mice. *Vet. Pathol.*, **15**: 770-775.
- ANDERSON, J.C. (1978b):** The problem of immunization against staphylococcal mastitis. *Brit. Vet. J.*, **134**: 412-420.
- ANDERSON, J.C. (1982):** Progressive pathology of staphylococcal mastitis with a note on control, immunisation and therapy. *Vet. Rec.*, **110**: 372-376.
- ANDERSON, J.C. (1983):** Mastitis in goats. *Goat. Vet. Soc. J.*, **4** (1): 17-21.
- ANDERSON, K.L., HUNT, E., DAVIS, B.J. (1991):** The influence of anti-inflammatory therapy on bacterial clearance following intramammary *Escherichia coli* challenge in goats. *Vet. Res. Commun.*, **15** (2): 147-161.
- ANDERSON, M., BROOKER, B.E., ANDREWS, A.T., ALICANIDIS, E. (1975):** Membrane material in bovine skim-milk from udder quarters infused with endotoxin and pathogenic organisms. *J. Dairy Res.*, **42**: 401-417.
- ANDREWS, R.J., KITCHEN, B.J., KWEE, W.S., DUNCALFE, F. (1983):** Relationship between individual cow somatic cell counts and the mastitis infection status of the udder. *Aust. J. Dairy Techn.*, **38**: 71-74.

BIBLIOGRAFIA

- ANON, (1977):** Report of the panel of the panel of the colloquium on bovine mastitis. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, **170**: 1119-1123.
- ASHWORTH, U.S., FORSTER, T.L., LUEDECKE, L.O. (1967):** Relationship between California Mastitis Test reaction and composition of milk from opposite quarters. *J. Dairy Sci.*, **50**: 1078.
- ATHERTON, H.V. (1983):** Regulation of goat milk production and Processing. *J. Food Prot.*, **46**: 931.
- AVILA, T.S., ROMERO, M.L., AGUERREBERE, J.A., AMEZURA, M.A., HURLEY, P.D. (1982):** California Mastitis Test and somatic cell number in relation to the infection of the mammary gland in goat at the end of lactation. Proc. III Int. Conf. Goat Production and Disease, az. *Dairy Goat Journal Publishing Co.*: 564.
- BABIOR, B.M. (1978):** Oxygen-dependent microbial killing by phagocytes. *New England J. Med.*, **298**: 659.
- BABIOR, B.M. (1984):** Oxidants from phagocytes: Agents of defense and destruction. *Blood*, **64**: 959-966.
- BAGADI, H.O., RAZIG, S.E. (1976):** Caprine Mastitis Caused by *Pasteurella mastitis* (*P. haemolytica*). *Vet. Rec*, **99**: 13.
- BAGGIOLINI, M., HORISBERGER, V., GENNARO, R., DEWALD, B. (1985):** Identification of three types of granules in neutrophils of ruminants: ultrastructure of circulating and maturing cells. *Lab. Invest.*, **52**: 151-158.
- BAGGOT, J.D. (1977):** Bioavailability and drug disposition in domestic animals. Part 1. *Vet. Tev.*, **24**: 66-76.
- BAINTON, D.F. (1972):** Origin, content and fate of PMN granules. En: Williams R.C. Jr., Fudenberg H.H., eds. *Phagocytic mechanisms in health and disease*. New York: Intercontinental Medical Book Corp., **16**: 123-136.
- BARGMANN, W., WELSCH, U. (1969):** On the ultrastructure of the mammary gland. *Lactogenesis: The initiation of milk secretion at parturition*. Ed. Univ. of Pennsylvania Press, Philadelphia: 43.
- BARILE, M.F., RAZIN, S., TULLY, J.G., WHITCOMB, R.F. (1979):** The Mycoplasmas. *1st edn. Vol II*, London. Academic Press.
- BAXENDELL, S.A. (1985):** Mastitis. Diseases and management of goats, held and Veterinary Science Farm; *Proceed. 73-goats*: 473-483.

BIBLIOGRAFIA

- BENDA, V. (1993).** Immunology of the mammary gland of cattle. *Berl Munch Tierarztl Wochenschr*, **106 (6)**: 181-183.
- BENNELL, M.A., WATSON, D.L. (1979):** The local immune response in the mammary gland of the sow following infusion of a protein antigen. *Microbiol. Immunol.*, **23**: 1225-1231.
- BIENENSTOCK, J., BEFUS, A.D. (1980):** Mucosal immunology, review. *Immunology*, **41**: 403-422.
- BJÖRKSTEN, B., GOTHEFORS, L., SIDDENVALL, R. (1979):** The effect of human colostrum on neutrophil function. *Pediatr. Res.*, **13**: 737-741.
- BLIKSLAGER, A.T., ANDERSON, K.L. (1992):** *Mycoplasma mycoides* subspecies *mycoides* as the cause of a subauricular abscess and mastitis in a goat. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, **201**: 1404-1406.
- BLOOD, D.C., RADOSTITS, O.M. (1992):** Mastitis. En *Medicina Veterinaria. Ed. Interamericana*, McGraw-Hill: 539-602.
- BLOSSER, T.H. (1979):** Economic losses from and the national research program on mastitis in the United States. *J. Dairy Sci.*, **62**: 119-127.
- BODDIE, R.L., NICKERSON, S.C. (1986):** Dry cow therapy: Effects of methods of drug administration on occurrence of intramammary infection. *J. Dairy Sci.*, **69**: 253-257.
- BODOH, G.W., BATTISTA, W.J., SCHULTZE, L.H., JOHNSTON, R.P. (1976):** Variation in somatic cell counts in dairy herd improvement milk samples. *J. Dairy Sci.*, **59**: 1119.
- BRAMBELL, F.W.R. (1970):** The transmission of passive immunity from mother to young. *Frontiers in Biolog.*, **18**: 201.
- BRANDON, M.R., WATSON, D.L., LASCELLES, A.K. (1971):** The mechanism of transfer of immunoglobulins into mammary secretions of cows. *Aust. J. Exp. Biol. Med. Sci.*, **49**: 613.
- BRAMLEY, A.J. (1978):** The effect of subclinical *Staphylococcus epidermidis* infection of the lactating bovine udder on its susceptibility to infection with *Streptococcus agalactiae* or *Escherichia coli*. *Br. vet. J.*, **134**: 146.
- BRAMLEY, A.J., DODD, F.H. (1984):** Reviews of the progress of dairy science: mastitis control progress and prospects. *J. Dairy Res.*, **51**: 481-512.
- BRANDON, M.R., LASCELLES, A.K. (1975):** The effect of prepartum milking on the transfer of immunoglobulin into the mammary secretion of cows. *Aust. J. Exp. Biol. Med. Sci.*, **53**: 197-204.

BIBLIOGRAFIA

- BRANDON, M.R., WATSON, D.L., LASCELLES, A.K. (1971):** The mechanism of transfer of immunoglobulin into the mammary secretion of cows. *Aust. J. Exp. Biol. Med. Sci.*, **49**: 613-623.
- BROWN, W.R., ISOBE, Y., NAKANE, P. (1975):** Ultrastructural localization of IgA and secretory component (SC) in human intestinal mucosa by immunoperoxidase techniques. *Gastroenterology (Abstract)*, **68**: 869.
- BRUECKER, K.A., SCHWARTZ, L.W. (1982):** Bovine peripheral blood polymorphonuclear neutrophil chemotactic response to *Pasterurella haemolytica* or zymosan-activated serum. *Am. J. Vet. Res.*, **43**: 1879-1881.
- BUDDLE, B.M., COOPER, M.G. (1978):** Aspects of epidemiology of bovine staphylococcal mastitis. *New Zealand, Vet. J.*, **20**: 296.
- BULLEN, J.J., ROGERS, H.J., LEIGH, L. (1972):** Iron-binding proteins in milk and resistance to *Escherichia coli* infection in infants. *Br. Med. J.*, **1**: 69-75.
- BUSWELL, J.F., KNIGHT, C.H., BARBER, D.M. (1989):** Antibiotic persistence and tolerance in the lactating goat following intramammary therapy. *Vet. Rec.*, **125**: 301-303.
- BUTLER, J.E. (1969):** Bovine immunoglobulins: A review. *J. Dairy Sci.*, **52**: 1895.
- BUTLER, J.E. (1974):** Immunoglobulins of the mammary secretions. *Lact.: A compreh. treat.*, **III**: 217-255.
- BUTLER, J.E. (1981):** A concept of humoral immunity among ruminants and an approach to its investigation. En Butler J.E. (ed.): En "Advances in Experimental Medicine and Biology". New York, *Plenum Press*, **137**: 3-55.
- BUTLER, J.E. (1983):** Bovine immunoglobulins: an augmented review. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, **4**: 43.
- CAFFIN, J.P., POUTREL, B., RAINARD, P. (1983):** Physiological and pathological factors influencing bovine immunoglobulin G₁ concentration in milk. *J. Dairy Sci.*, **66**: 2161-2166.
- CAFFIN, J.P., POUTREL, B. (1988):** Physiological and pathological factors influencing bovine immunoglobulin G₂ concentration in milk. *J. Dairy Sci.*, **71 (8)**: 2035-2043.
- CAMPBELL, B., PORTER, R.M., PETERSEN, W.E. (1950):** Plasmacytosis of the bovine udder during colostrum secretion and experimental cesation of milking. *Nature*, **166**: 913.
- CAPUCO, A.V., PAAPE, M.J., NICKERSON, S.C. (1986):** In vitro study of polymorphonuclear leukocyte damage to mammary tissues of lactating cows. *Am. J. Vet. Res.*, **(3)**: 663-668.

BIBLIOGRAFIA

- CARUOLO, E.V. (1974):** Milk yield, composition and somatic cells as a function of time of day in goats under a continuous lighting regimen. *Br. Vet. J.*, **130**: 380-387.
- CARROLL, E.J. (1977):** Environmental factors in bovine mastitis. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, **170**: 1143-1149.
- CARROLL, E.J. (1979):** The role of lysozyme in killing and lysis of coliform bacteria in the bovine animal. I. Serum and milk concentrations of lysozyme and susceptibility of coliform strains to its action. *Vet. Microbiol.*, **4**: 61-72.
- CARROLL, E.J., MUELLER, R., PANICO, L. (1982):** Chemotactic factors for bovine leukocytes. *Am. J. Vet. Res.*, **43**: 1661-1664.
- CASADO, P.; BLANCO, C. (1978):** Métodos instrumentales para el recuento de células somáticas en la leche. En "Métodos instrumentales para el análisis de la leche". Ed. Anque: 193-211.
- CATTY, D., RAYKUNDALIA, C. (1988):** Gel immunodiffusion, immunoelectrophoresis and immunostaining methods. En "Antibodies: A practical approach". Catty D. (ed.), *IRL Press. Oxford*, **1**: 137-167.
- CHANG, C.C., WINTER, A.J., NORCROSS, N.L. (1981):** Immune response in the bovine mammary gland after intestinal, local, systemic immunization. *Infect. Immun.*, **31**: 650.
- CIUPERCESCU, D.D. (1977):** Dynamics of serum immunoglobulin concentration in sheep during pregnancy and lactation. *Res. Vet. Sci.*, **22**: 23-27.
- COHN, Z.A. (1978):** The activation of mononuclear phagocytes: fact, fancy, and future. *J. Immunol.*, **121**: 813.
- COLDITZ, I.G., WATSON, D.L. (1985):** The immunophysiological basis for vaccinating ruminants against mastitis. *Austr. Vet. J.*, **62**: 145-153.
- COLLINS, J.A., RAKES, J.M., KASIREDDY, N., YAZMAN, J. (1982):** Relationship of somatic cell count with California Mastitis Test in establishing goat herd health. *J. Dairy Sci.*, **65** (Suppl. 1): 78.
- CONCHA, C., HOLMBERG, O., MOREIN, B (1978):** Proportion of B- and T-lymphocytes in normal bovine milk. *J. Dairy Res.*, **45**: 287.
- CONTRERAS DE VERA, A., CORRALES, J.C., SIERRA, D., MARCO MELERO, J. (1992):** Mamitis subclínicas en cabras Murciano-Granadinas. *XXII Jornadas Científicas de la SEOC*, Salamanca (España).

BIBLIOGRAFIA

CORRALES, J.C., SIERRA, D., MARCO MELERO, J.C., CONTRERAS DE VERA, A. (1992): Sensibilidad antibiótica "in vitro" de estafilococos y corinebacterias aislados de mamitis subclínicas caprinas. *XVII Jornadas Científicas de la SEOC*, Salamanca, España.

COTTEW, G.S. (1982): Significance of *Mycoplasma* in goats. *Proceed., 3rd Int. Conf. Goat Prod. Dis.*: 221-225.

CRAIG, S.W., CEBRA, J.J. (1971): Peyer's patches: An enriched source of precursors for IgA producing immunocytes in the rabbit. *J. Exp. Med.*, 134: 188.

CRAVEN, N. (1983): Generation of neutrophil chemoattractants by phagocytosing bovine mammary macrophages. *Res. Vet. Sci.*, 35: 310-317.

CRAVEN, N., ANDERSON, J. (1984): Phagocytosis of *Staphylococcus aureus* by bovine mammary gland macrophages and intracellular protection from antibiotic action in vitro and in vivo. *J. Dairy Res.*, 51: 513-523.

CRAVEN, N., WILLIAMS, M.R. (1985): Defences of the bovine mammary gland against infection and prospects for their enhancement. *Vet. Immun. and Immunopat.*, 10: 71-127.

CRIPPS, A.W., FULKERSON, W.J., GRIFFITHS, D.A., McDOWELL, G.H., LASCELLES, A.K. (1976): The relationship between the transfer of immunoglobulin, sodium and potassium into mammary secretion of the parturient ewe. *Aust. J. Exp. Biol. Med. Sci.*, 54: 337-348.

CRIPPS, P. (1986): Prevention and control of mastitis in goats. *Goat Vet. Soc. J.*, 7 (2): 48-51.

CULLEN, G.A. (1965): The use of Electronic Counters for determining the number of cells in milk. *Vet. Rec.*, 77: 858.

CULLEN, G.A. (1966): Cells in milk. *Vet. Bull.*, 36: 337-346.

CULLEN, G.A. (1966): Cell counts throughout lactation. Physiological variation in the cell count of cows' milk during lactation. *Vet. Rec.*, 83: 125-128.

CULLOR, J.S., TYLER, J.W., SMITH, B.P. (1990): Disorders of the Mammary Gland. En "Large Animal Internal Medicine", ed. Smith, *The C.V. Mosby Company, USA*: 1047-1067.

DAHIYA, B.S., KAPUR, M.P. (1988): Radial-immunodiffusion test for the diagnosis of subclinical mastitis in buffaloes. *Proceed. II World Buffalo Congress*, held at New Delhi, India: 48-51.

BIBLIOGRAFIA

- DAVIS, B.D., DULBECO, R., EISEN, H.N., GINSBERG, H.S., WOOD, W.D. (1980): Microbiology. *Harper and Row*, New York: 400.
- DAVIS, J.G. (1947): The rapid abnormality indicator. *Dairy Ind.*, 12: 35-41.
- DAVIDSON, I. (1961): Observations on the pathogenic staphylococci in a dairy herd during a period of six years. *Res. Vet. Sci.*, 2: 22.
- DAVITIYANANDA, D., RASMUSSEN, F. (1974): Half-lives of sulphadone and trimethoprim after a single intravenous infusion in cows. *Acta Vet. Scand.*, 15: 356-365.
- DE BUYSER, M.L., DILASSER, F., HUMMEL, F., BERGDOLL, M.S. (1987): Enterotoxin and toxic shock syndrome toxin-1 production by staphylococci isolated from goats milk. *Int. J. of Food Microb.*, 5: 301-309.
- DeCUENINCK, B.J. (1979): C₁₄₂ complement activity and conglutinogen in bovine milk. *Int. Arch. Allergy Appl. Immunol.*, 59: 323.
- DeCUENINCK, B.J. (1979): Immuned-mediated inflammation in the lumen of the bovine mammary gland. *Int. Arch. Allergy Appl. Immunol.*, 59: 394.
- DELAMPRE, C., MARCHAND, M., CATEL, J. (1984): Bovine mastitis caused by *Bacillus cereus*. *Dairy Sci. Abstr.*, 46: 3090.
- DELOUIS, C. (1978): Physiology of colostrum production. *Annu. Rech. Vet.*, 9: 193.
- DERBYSHIRE, J.B., SMITH, G.S. (1969): Immunization against staphylococcal mastitis in the goat by intramammary infusion of cell toxoid vaccine. *Res. Vet. Sci.*, 10: 559-564.
- DESIDERIO, J.V., CAMPBELL, S.G. (1980): Bovine mammary gland macrophage: isolation, morphologic features and cytophilic immunoglobulins. *Am. J. Vet. Res.*, 41: 1595.
- DEVRIESE, L.A. (1979): Identification of clumping factor-negative staphylococci isolated from cow's udders. *Res. Vet. Sci.*, 27: 313
- DEVRIESE, L.A., DE KEYSER, H. (1980): Prevalence of different species of coagulase-negative staphylococci on teats and in milk samples from dairy cows. *J. Dairy Res.*, 47: 155-158.
- DIJMAN, A.J., SCHIPPER, C.J., WALSTRA, P. (1966): Vorloopig Medeling over de Toepassing van de "Coulter Counter" voor de Bepaling van het Colgetal van Melk. *Neth. Milk Dairy J.*, 20: 193-203.
- DIXON, F.J., WEIGLE, W.O., VAZQUEZ, J.J. (1961): Metabolism and mammary secretion of serum proteins in the cow. *Lab. Invest.*, 10 (2): 216-236.

BIBLIOGRAFIA

- DOBBINS, C.N. (1977):** Mastitis losses. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, **170**: 1129-1132.
- DODD, F.H. (1983):** Mastitis-Progress on control. *J. Dairy Sci.*, **66**: 1773-1780.
- DROVE, E.A., PAAPE, M.J., DI CARLO, A.L. (1993):** Prevalence of high somatic cell counts in bulk tank goat milk. *J. Dairy Sci.*, **76** (4): 1035-1039.
- DULIN, A.M., PAAPE, M.J., WERGIN, W.P. (1982):** Differentiation and enumeration of somatic cells in goat milk. *J. Food Prot.*, **45**: 435-439.
- DULIN, A.M., PAAPE, M.J., SCHULTZE, W.D., WEINLAND, B.T. (1983):** Effect of parity, stage of lactation, and intramammary infection on concentration of somatic cells and cytoplasmic particles in goat milk. *J. Dairy Sci.*, **66**: 2426-2433.
- DU PREEZ, J.H. (1981):** Die prevalensie, aard en betekenis van anaërobiese bakterieë in die melkkoei-uier. *MMed. Vet. (Hyg)-dissert.* University of Pretoria.
- DU PREEZ, J.H. (1985):** Speenkanaalinfeksies by melkkoeie: Diagnose, voorkoms, aard, terapie, omvang en betekenis. DVSc thesis, University of Pretoria.
- DU PREEZ, J.H. (1986):** Comparison of various criteria for determining the health status of the bovine udder. *J. S. Afr. Vet. Assoc.*, **56**: 191-194.
- DU PREEZ, J.H. (1989):** Reasons why mastitis therapy is unsuccessful. *S. Afr. J. Dairy Sci.* **21** (1): 21-29.
- EAST, N.E., BIRNIE, E.F., FARVER, T.B. (1987):** Risk factors associated with mastitis in dairy goats. *Am. J. Vet. Res.*, **48** (5): 776-779.
- EDDY, R.G. (1977):** Coliform and pseudomonad mastitis: Epidemiology and control. *Vet. Rec.*, **100**: 441-442.
- EHRLICH, P. (1892):** Über immunität durch verbung und säugung. *Zeits. Hyg. Infek.*, **12**: 183.
- EL-SERGANY, M., FAHMY, L., HEGGAZY, A., BAKEER, A. (1982):** Studies on mastitis in goats. *J. Egypt. Vet. Med. Ass.*, **42** (2): 77-88.
- EL-YAS, A.H., and NASHED, S.M. (1988):** Bacteriological studies on mastitis in sheep-goats. *Assiut. Vet. Med. J.*, **20** (40): 37-42.
- ERB, R.E., RANDEL, R.D., MELLIN, T.N., ESTERGREEN, V.L. (1968):** Urinary estrogen excretion rates during pregnancy in the bovine. *J. Dairy Sci.*, **51**: 416.
- ERSKINE, R.J., UNFLAT, J.G., EBERHART, R.J., HUTCHINSON, L.J., HICKS, C.R.,**

BIBLIOGRAFIA

- SPENCER, S.B. (1987):** Pseudomonas mastitis: Difficulties in detection and elimination from contaminated wash-water systems. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, **191** (7): 811-815.
- FAHEY, J.L., McKELVEY, E.M. (1965):** Quantitative determination of serum immunoglobulins in antibody agar plates. *J. Immunol.*, **94**: 84.
- FANTONE, J.C., WARD, P.A. (1982):** A review: role of oxygen-derived free radicals and metabolites in leukocyte-dependent inflammatory reactions. *Am. J. Pathol.*, **107**: 395-418.
- FARNSWORTH, R.J. (1979):** Mastitis: prevention and control. *Dairy Goat J.*, **57**: 12-14.
- FARNSWORTH, R.J., SIEBER, R.L. (1979):** Prevention and control of mastitis in dairy goats. *Vet. Med./Small Animal Clinician*: 1344-1346.
- FELDMAN, J.D. (1961):** Fine structure of the cow's udder during gestation and lactation. *Lab. Invest.*, **10**: 238.
- FERNANDO, R.S., RINDSIG, R.B., SPAHR, S.L. (1981):** Effect of length of milking interval and fat content on milk conductivity and its use for detecting mastitis. *J. Dairy Sci.*, **64**: 678-682.
- FERRER, O., REAL, F., ACOSTA, B. (1993):** Estudio de las mastitis clínicas en la cabra canaria. *Med. Vet.*, **10** (10): 558-566.
- FINEGOLD, S.M., ROSENBLATT, J.E., SUTTER, V.C., ATTEBERRY, H.R. (1971):** Anaerobic infections. *Scope Monograph*. BA Thomas (ed). The Upjohn Company, Kalamazco, Michigan.
- FLESCH, I., KAUFMAN, S.H.E. (1987):** Mycobacterial growth inhibition by interferon gamma activated bone marrow macrophages and differential susceptibility among strains of *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Immunol.*, **138**: 4408-4413.
- FONG, J.S.C., MUSCHEL, L.H., GOOD, R.A. (1971):** Kinetics of bovine complement. I. Formation of a lytic intermediate. *J. Immunol.*, **107**: 28-34.
- FORBES, D. (1968):** The passage of staphylococci through the bovine teat canal. *J. Dairy Res.*, **35**: 399-406.
- FOX, L.K., HEALD, C.W., GWAZDAUSKAS, F.C., VINSON, W.E. (1981):** Concentrations of glucocorticoids, bovine serum albumine and somatic-cells in mastitis milk. *J. Dairy Sci.*, **64**: 2258.
- FOX, L.K., LIGGIT, H.D., YILMA, T., CORBEIL, L.B. (1990):** The effect of interferon-gamma intramamary administration on mammary phagocyte function. *J. Vet. Med.*, **37**: 28-30.

BIBLIOGRAFIA

FOX, L.K., McDONALD, J.S. (1987): Functional activity of milk phagocytes collected from mammary quarters infected with *Staphylococcus aureus*. En *Eighth Annu. Western Food Anim. Dis. Res. Conf. Univ. Idaho, Boise*: 2.

FOX, L.K., McDONALD, J.S. (1988): Functional activity of neutrophils from bovine mammary glands infected with *Staphylococcus aureus*. *J. Dairy Sci.*, **71**: 3521-3524.

FOX, L.K., SHOOK, G.E., SCHULTZ, L.H. (1985): Factors Related to Milk Loss in Quarters with Low Somatic Cell Counts. *J. Dairy Sci.*, **68**: 2100-2107.

FRANK, N.A., POUNDEN, W.D. (1961): Prevalence of bovine mastitis during various stages of lactation. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, **138**: 184.

FRAYER, J.M. (1940): The dissolved gases in milk and dye reduction. *Vet. Agric. Exp. Stn. Bull.*, **461**: 1.

FROST, A.J. (1975): Selective adhesion of microorganisms to the ductular epithelium of the bovine mammary gland. *Infect. Immun.*, **12**: 1154-1156.

FROST, A.J., WANASINGHE, D.D., WOOLCOCK, J.B. (1977): Some factors affecting selective adherence of microorganisms in the bovine mammary gland. *Infect. Immun.*, **15**: 245-253.

FUNKE, H. (1961): The distribution of S³⁵-labelled benzylpenicillin in normal and mastitic mammary glands of cows and goats after local and systemic administration. *Acta Vet. Scand.*, **2**: 1-88.

GALLIN, J.L., GALLIN, E.K., SCHIFFMANN, E. (1979): Mechanism of leukocyte chemotaxis. *Adv. Inflamm. Res.*, **1**: 123.

GENNARO, R., DEWALD, B., HORISBERGER, V., GUBLER, H.V., BAGGIOLINI, M. (1983): A novel type of cytoplasmic granule in bovine neutrophils. *J. Cell. Biol.*, **96**: 1651-1661.

GENNARO, R., DOLZANI, L., ROMEO, D. (1983): Potency of bactericidal proteins purified from the large granules of bovine neutrophils. *Infect. Immun.*, **40**: 684-690.

GIBBSON, R.J., VAN HOUTE, J. (1971): Selective bacterial adherence to oral epithelial surfaces and its role as an ecological determinant. *Infect. Immun.*, **3**: 567-573.

GIESECKE, W.H. (1979): Bovine Mastitis. Department of Agricultural Technical Services, Republic of South Africa, Technical Communications, N° 51: 1-37.

BIBLIOGRAFIA

GIESECKE, W.H., VAN DEN HEEVER, L.W. (1974): The diagnosis of bovine mastitis with particular reference to subclinical mastitis: A critical review of relevant literature. *Onderstepoort J. Vet. Res.*, 41: 169.

GIESECKE, W.H., VAN DEN HEEVER, L.W., DU TOIT, I.J., BEYER, M.C.E. (1973): The diagnosis of bovine mastitis: A critical evaluation of a polyvalent radial immunodiffusion test and other methods. *Onderstepoort J. Vet. Res.*, 40: 57-66.

GIESECKE, W.H., VILJÖEN, M.H. (1974): The diagnosis of subclinical mastitis in lactating cows: a comparison of cytological methods and monovalent radial immunodiffusion test. *Onderstepoort J. Vet. Res.*, 41: 51.

GOLDSTEIN, I.N., WEISSMANN, G. (1979): Non-phagocytic stimulation of human polymorphonuclear leukocytes: Role of the plasma membrane. *Semin. Hematol.*, 16: 175.

GONZALEZ, R.N., JASPER, D.E., KRONLUND, N.C., FARVER, T.B., CULLOR, J.S., BUSHNELL, R.B., DELLINGER, J.D. (1990): Clinical mastitis in two California dairy herds participating in contagious mastitis control programs. *J. Dairy Sci.*, 73: 648-660.

GOUDSWAARD, J., BAKKER-DE KOFF, E.C., VAN RAVENSWAAIJKRAAN, H.P.M. (1978): Lysozyme and its presence in bovine milk and serum. *Tijdschr. Diegeneesk.*, 103: 445-450.

GRANT, C.K. (1977): Complement "specificity" and interchangeability: Measurement of hemolytic complement levels and use of the complement-fixation test with sera from common domesticated animals. *Am. J. Vet. Res.*, 38: 1611-1617.

GRAPPIN, R., JEUNET, R. (1971): Essais de l'appareil "Compteur Coulter" utilisé pour la détermination du nombre de cellules totales des laits de troupeaux. *Le Lait*: 273-283.

GRAY, G.D., KNIGHT, K.A., NELSON, R.D., HERRON, M.J. (1982): Chemotactic requirements of bovine leukocytes. *Am. J. Vet. Res.*, 43: 757-759.

GREWAL, A.S., ROUSE, B.T., BABIUK, L.A. (1978): Characterization of surface leukocytes. *Int. Arch. Allergy Appl. Immunol.*, 56: 289.

GRIEVE, P.A., MATTILA, T. (1989): Non-oxidative antibacterial activity of bovine neutrophil granule proteins towards mastitis pathogens. *J. Vet. Med. B*, 36: 500-508.

GRIFFIN, F.M. (1982): Mononuclear cell phagocytic mechanisms and host defense. *Adv. Host Defense Mechanisms*, 1: 31.

GRIFFIN, T.K., DODD, F.H., NEAVE, F.K., WESTGARTH, D.R., KINGWILL, R.G., WILSON, C.D. (1977): A method of diagnosing intramammary infection in dairy cows for large experiments. *J. Dairy Res.*, 44: 25-45.

BIBLIOGRAFIA

- GROOTENHUIS, G. (1980):** Milk cell count in machine milked dairy goats. *Vet. Quarterly*, 2: 121-123.
- GUDDING, R., McDONALD, J.S., CHEVILLE, N. (1984):** Pathogenesis of *Staphylococcus aureus* mastitis: bacteriologic, histologic and ultrastructural pathologic findings. *Am. J. Vet. Res.*, 45: 2525.
- GUHA, C., PRAMANIK, A.K., MISRA, S.K., BANERJEE, A.K. (1989):** Studies on the incidence and diagnosis of sub-clinical and clinical mastitis in goats and in vitro sensitivity of the isolated pathogens. *Indian Vet. J.*, 66 (7): 601-604.
- GUIDRY, A.J., BUTLER, J.E., PEARSON, R.E., WEINLAND, B.T. (1980):** IgA, IgG₁, IgG₂, IgM, and BSA in serum and mammary secretion throughout lactation. *Vet. Immun. Immunopath.*, 1: 329-341.
- GUIDRY, A.J., MILLER, R.H. (1986):** Immunoglobulin isotype concentrations in milk as affected by stage of lactation and parity. *J. Dairy Sci.*, 69: 1799-1805.
- GUIDRY, A.J., PAAPE, M.J., PEARSON, R.E. (1980):** Effect of udder inflammation on milk immunoglobulins and phagocytosis. *Am. J. Vet. Res.*, 41 (5): 751-753.
- GUIDRY, A.J., PEARSON, R.E.; PAAPE, M.J., WILLIAMS, W.F. (1980):** Relationship among leukocyte phagocytosis, milk immunoglobulins, and susceptibility to intramammary infection. *Am. J. Vet. Res.*, 41: 997-1001.
- GUIDRY, A.J., MILLER, R.H. (1985):** Immunoglobulin isotype concentration in milk as affected by stage of lactation and parity. *J. Dairy Sci.*, 69: 1799.
- GUSS, S.B. (1977):** Management and diseases of dairy goats. Mastitis in goats. *Dairy Goat J. Publ. Corp. Scottsdale, Arizona 85252*: 116-127.
- HAKAK-BERENJI, S.N., JAIN, N.C. (1983):** Antibacterial activity of bovine blood neutrophils and their cationic proteins. *J. Dairy Sci.*, 66: 1377-1383.
- HALLIDAY, R., RUSSELL, A.J.F., WILLIAMS, M.R., PEART, J.N. (1978):** Effect of energy intake during late pregnancy and of genotype on immunoglobulin transfer to calves in suckler herds. *Res. Vet. Sci.*, 24: 26-31.
- HAMMER, D.K., KICKHÖFEN, B., MALCHOW, H. (1969):** Preferential absorption of a single bovine IgG type by isolated epithelial cells of the mammary gland. *In* Protides of the biological fluids. H. Peters, ed. Pergamon Press, N.Y.: 663.
- HANSON, L.A., CARLSSON, B., CRUZ, J.R. (1979):** Immune response in the mammary gland. En Ogra PL, Dayton D (ed.): *Immunology of Breast Milk*. New York, Raven Press: 145-157.

BIBLIOGRAFIA

HARLOW, E., LANE, D. (1988): Antibodies. A laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory, USA: 53-137.

HARMON, R.J., HEALD, C.W. (1982): Migration of polymorphonuclear leukocytes into the bovine mammary gland during experimentally induced *Staphylococcus aureus* mastitis. *Am. J. Vet. Res.*, **43**: 992-998.

HARMON, R.J., SCHANBACHER, F.L., SMITH, K.L. (1976): Changes in lactoferrin, immunoglobulin G, bovine serum albumin, a lactalbumin during acute experimental and natural coliform mastitis in cows. *Infect. Immun.*, **13**: 533.

HARVEY, J., GILMOUR, A. (1988): Isolation and characterization of staphylococci from goats milk produced in Northern Ireland. *Letters in Applied Microb.*, **7**: 79-82.

HEAD, J.R., BEER, A.E. (1979): In vivo and in vitro assessment of the immunologic role of leukocytic cells in milk. En Ogra PL, Dayton D (ed.): Immunology of Breast Milk. New York, Raven Press: 207-225.

HEMMINGS, W.A. (1976): Maternofoetal transmission of immunoglobulins. *Proc. Symp. on Trans. of Immun. from Mother to Young*, Cambridge University Press, London.

HIBBIT, K.G., BROWNLIE, J., COLE, C.B. (1971): The antimicrobial activity of cationic proteins isolated from the cells in bulk milk swamps. *J. Hyg. Camb.*, **69**: 61-68.

HILL, A.W. (1981): Factors influencing the outcome of *Escherichia coli* mastitis in the dairy cow. *Res. Vet. Sci.*, **31**: 107-112.

HILL, A.W., HENEGHAN, D.J.S., FIELD, T.R., WILLIAMS, M.R. (1983): Increase in specific opsonic activity in bovine milk following experimental *E. coli* mastitis. *Res. Vet. Sci.*, **35**: 222.

HILL, A.W., SHEERS, A.L., HIBBIT, K.G. (1978): The elimination of serum-resistant *Escherichia coli* from experimentally infected single mammary glands of healthy cows. *Res. Vet. Sci.*, **25**: 89-93.

HILPERT, H., ENKELMAN, D. (1964): Ein einfacher immunologischer Test zur anomaler Sekretion *Milchwissenschaft*, **19**: 475-480.

HINCKLEY, L.S. (1983): Somatic cell count in relation to caprine mastitis. *Vet. Med. Small Anim. Clin.*: 1267-1271.

HINCKLEY, L.S., POST, J.E., DUVAL, M.C. (1985): The role of nonhemolytic staphylococci in caprine mastitis. *Vet. Med.*: 76-80.

BIBLIOGRAFIA

- HINCKLEY, L.S., WILLIAMS, L.F. (1981):** Diagnosis of mastitis in goats. *Vet. Med. Small Anim. Clin.*, **76**: 711-712.
- HOGAN, J.S., PANKEY, J.W., DUTHIE, A.H. (1987):** Growth responses of *Staphylococcus aureus* and *Streptococcus agalactiae* to *Corynebacterium bovine* metabolites. *J. Dairy Sci.*, **70**: 1294.
- HOGAN, J.S., SMITH, K.L. (1987):** Growth inhibition of mastitis pathogens to long chain fatty acids. *J. Dairy Sci.*, **70**: 927.
- HOHN, D.C., MacKAY, R.D., HUNT, T.K. (1976):** The effect of oxygen tension on the microbicidal function of leukocytes in wounds and in vitro. *Surg. Forum*, **27**: 18.
- HOLMBERG, O. (1973):** *Staphylococcus epidermidis* isolated from bovine milk. *Acta Vet. Scand.*, **45**: 144.
- HOOVER, D.G., TATINI, S.R., MALTAIS, J.B. (1983):** Characterization of staphylococci. *Appl. and Envir. Microb.* **46**: 649-660.
- HOWARD, W.H., KNIGHT, T.O., SHUMWAY, C.R. (1987):** Information and herd health management practices in Texas dairies. *Southern J. Agr. Eco.*, **19**: 1-10.
- HUNTER, A.C. (1984):** Microflora and somatic cell count of goat milk. *Vet. Rec.*, **114**: 318-320.
- HUNTER, D.L., ERB, R.E., RANDEL, H.A., GARVERICK, C.J., CALLAHAN, C.J., HARRINGTON, R.B. (1970):** Reproductive steroids in the bovine. I. Relationships during late gestation. *J. Animal Sci.*, **30**: 47.
- HUSBAND, A.J., MONIE, H.J., GOWANS, J.L. (1977):** The natural history of cells producing IgA in the gut. *Immun. of the gut. Ciba Found. Sympos.*, **46, Holland**: 29.
- HUTTON, C.T., FOX, L.K., HANCOCK, D.D. (1990):** Mastitis Control Practices: Differences Between Herds with High and Low Milk Somatic Cell Counts. *J. Dairy Sci.*, **73**: 1135-1143.
- INTERNATIONAL DAIRY FEDERATION (1979):** Somatic cells in milk: their significance and recommended methods for counting. Document 114.
- INTERNATIONAL DAIRY FEDERATION (1981):** Laboratory methods for use in mastitis work. Document 132, Brussels.
- INTERNATIONAL DAIRY FEDERATION (1984):** Recommended methods for somatic cells counting in milk. Document 168, Brussels.

BIBLIOGRAFIA

- ISMAIL, M., SELIM, S.A., ARAB, S.M., SOLIMAN, R., SOLIMON, A.S. (1984):** Changes in lysozyme activity in milk and its significance in the diagnosis of subclinical mastitis in goats. *Vet. Med. J.*, 32 (1): 59-65.
- JACKSON, A.L., DAVIS, N.C. (1984):** Cuantificación de inmunoglobulinas. En "El laboratorio en inmunología clínica". Edit. Med. Panamericana, 2ª edic.: 149-162.
- JAIN, N.C. (1976):** Neutrophil leukocytes and inflammation of the bovine mammary gland. *Theriogenology*, 6: 153-173.
- JANOTA-BASSALIK, L., ZAJAK, M., PIOTROWSKA, E. (1975):** Differences among cows in the influence of experimental mastitis on milk globulins. *Proceed. Internat. Dairy Fed.:* 243-248
- JENSEN, D.L., EBERHART, R.J. (1975):** Macrophages in bovine milk. *Am. J. Res.* 36:619-624.
- JOKLIK, W.K., WILLET, M.P. (1976):** En Microbiology. 16th ed. Appleton-Century-Crofts. New York: 324.
- JONES, G.E. (1949):** A statistical examination of conductivity values for aseptically drawn milk samples. *Proc. Soc. Appl. Bact. Engl.:* 29.
- JONES, G.M., PEARSON, R.E., CLABAUGH, G.A. (1984):** Relationships between somatic cell counts and milk production. *J. Dairy Sci.*, 67: 1823-1831.
- JONES, T.C., HIRSCH, J.G. (1971):** The interaction in vitro of mycoplasma pulmonis with mouse peritoneal macrophages and L-cells. *J. Exp. Med.*, 133: 231.
- KAKOMA, I., KINYAUJUI, M. (1974):** Complement levels of normal cattle. *Res. Vet. Sci.*, 16: 395-397.
- KALOGRIDOU-VASSILIADOU, D. (1991):** Mastitis-related pathogens in goat milk. *Small Rum. Res.*, 4: 203-212.
- KALOGRIDOU-VASSILIADOU, D., MANOLKIDIS, K., HATZIMINAOGLOU, J. (1991):** Changes in mastitis pathogens in goat milk throughout lactation. *Small Rum. Res.*, 4: 197-201.
- KALOGRIDOU-VASSILIADOU, D., MANOLKIDIS, K., TSIGOIDA, A. (1992):** Somatic cell counts in relation to infection status of the goat udder. *J. Dairy Res.*, 59: 21-28.
- KALRA, D.S., SHARMA, R.M., DHANDA, M.S. (1962):** Mastitis in goats. *Indian J. Vet. Sci.*, 32: 181-189.

BIBLIOGRAFIA

- KAPTURE, J. (1980):** Somatic counts don't tell whole mastitis story with goat milk. *Dairy Goat Guide*, 3: 9.
- KAPUR, M.P., SHARMA, A., SINGH, R.P. (1984):** In vitro chemotherapeutic sensitivity of microorganisms isolated from clinical cases of mastitis in cows, buffaloes and goats in Hissar area of Haryana state. *Indian J. Comp. Microb. Immunol. Infect. Dis.*, 5, (3): 120-122.
- KELLER, H.U., HESS, M.W., COTTIER, H. (1975):** Physiology of chemotaxis and random motility. *Semin. Hematol.*, 12: 47.
- KEMLER, R., MOSSMANN, H., STROHMAIER, B., KICKHÖFEN, B., HAMMER, D.K. (1975):** In vitro studies on the selective binding of IgG from different species to tissue sections of the bovine mammary gland. *Europ. J. Immunol.*, 5: 603.
- KERLIN, R.L. (1988):** Modulation of IgG subclass expression during antibody responses. *Res. Vet. Sci.*, 45: 353-359.
- KICKHOFEN, B., HAMMER, D.K., SCHEEL, D. (1968):** Isolation and characterization of gG type immunoglobulins from bovine serum and colostrum. *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.*, 349: 1755.
- KIRCHHOFF, H., BINDER, A., SCHMID, G., KAHLAU, D. (1985):** Isolation of mycoplasma mycoides from milk goats in South Germany. Contagious agalactia and other mycoplasmal diseases of small ruminants. *Proceed. Workshop Held in Nice, France*: 51- 57.
- KITCHEN, B.J. (1981):** Review of the progress of dairy science: Bovine mastitis: Milk compositional changes and related diagnostic tests. *J. Dairy Res.*, 48: 167.
- KLEBANOFF, S.J. (1968):** Myeloperoxidase-halide-hydrogen peroxide antibacterial system. *J. Bacteriol.*, 95: 2131-2138.
- KLEBANOFF, S.J., HAMON, C.B. (1975):** Antimicrobial systems of mononuclear phagocytes. En "Mononuclear phagocytes in immunity, infection and pathology". ed. *Blackwells*, Oxford: 507.
- KLEINSCHROTH, E., RABOLD, K., DENEKE, J. (1989):** La mastitis. Ed. *Gründland*, Barcelona.
- KLOBASA; VON, F., SENFT, B., MEYER, F. PFLEIDERER, W.E. (1977):** Untersuchungen über Lactoferrin und Immunoglobulin G in der Kuhmilch. *Zuchtungskunde*, 49 (2): 110.
- KOHL, S., PICKERING, L.K., CLEARLY, T.G., STEIMETZ, K.D., LOO, L.S. (1980):** Human colostrum cytotoxicity. II. Relative defects in colostrum leukocyte cytotoxicity and inhibition of peripheral blood leukocyte cytotoxicity by colostrum. *J. Infect. Dis.*, 142: 884.

BIBLIOGRAFIA

- KRAEHENBUHL, J.P., JAMIESON, J.D. (1974):** Localization of intracellular antigens by immunoelectron microscopy. *Int. Rev. Exp. Pathol.*, 13: 1.
- KRAEHENBUHL, J.P., RACINE, L., GALARDY, P.E. (1975):** Localization of secretions IgA, secretory component, and chain in the mammary gland of lactating rabbits by immunoelectron microscopy. *Ann. New York Acad. Sci.*, 254: 190.
- KRIEG, N.R., HOLT, J.G. (1983):** En Bergey's Manual of Systematic Bacteriology (P.H., Sneath, N.S., Mair, M.E., Sharpe and J.B., Holt. Eds.) *Edit. Williams & Wilkins*. Baltimore. Vol.I.
- LARSON, B.L. (1958):** Transfer of specific blood serum proteins to lacteal secretions near parturition. *J. Dairy Sci.*, 41: 1033.
- LARSON, B.L. (1979):** Biosynthesis and secretion of milk proteins: a review. *J. Dairy Res.*, 46: 161.
- LARSON, B.L. (1985):** Lactation. *Larson ed.*, Ames, Iowa State University Press: 229.
- LARSON, B.L., HEARY, H.L., DEVERY, J.E. (1980):** Immunoglobulin Production and Transport by the Mammary Gland. *J. Dairy Sci.*, 63: 665-671.
- LASCELLES, A.K. (1969):** Immunoglobulin secretion into ruminant colostrum. En "Lactogenesis: The initiation of milk secretion at parturition". *Ed. Univ. of Pennsylvania Press*, Philadelphia: 131.
- LASCELLES, A.K. (1971):** Mechanisms of milk synthesis and secretion. *Proc. 18th Int. Dairy Congr. Sydney*, 2: 514.
- LASCELLES, A.K. (1979):** The immune system of the ruminant mammary gland and its role in the control of mastitis. *J. Dairy Sci.*, 62: 154-160.
- LASCELLES, A.K., BEH, K.J., HUSBAND, A.J. (1980):** Origin of antibody in mammary secretion with particular reference to the IgA system. *Adv. Experim. Med. Biol.*, 137: 493-511.
- LASCELLES, A.K., LEE, C.S. (1978):** Involution of the mammary gland. En "Lactation: A comprehensive treatise. B.L. Larson (ed.), *Academic Press*, New York, 4: 115.
- LASCELLES, A.K., McDOWELL, G.H. (1974):** Localized humoral immunity with particular reference to ruminants. *Transplant. Rev.*, 19: 170-208.
- LEE, C.S., LASCELLES, A.K. (1970):** Antibody-producing cells in antigenically stimulated mammary glands and in the gastrointestinal tract of sheep. *Aust. J. Exp. Biol. Med. Sci.*, 48: 525-535.

BIBLIOGRAFIA

LEE, C.S., OUTERIDGE, P.M. (1976): Identification and ultrastructure of macrophages from the mammary gland of the ewe. *Austr. J. Exp. Biol. Med. Sci.* **54:** 43-55.

LEE, C.S., WOODING, F.B.P., KEMP, P. (1980): Identification, properties, and differential counts of cell populations using electron microscopy of dry cows secretions, colostrum and milk from normal cows. *J. Dairy Sci.*, **47:** 39-50.

LEHRER, R.J., LADRA, K.M., HAKE, R.J. (1975): Non-oxidative fungicidal mechanisms of mammalian granulocytes: demonstration of components with candidacidal activity in human, rabbit and guinea-pig leucocytes. *Infect. Immun.*, **11:** 1226-1234.

LEON, L., BERRIEL, C., GARRIDO, F. (1985): Mamitis caprina en Fuerteventura (Islas Canarias). Simposio Internacional sobre la explotación caprina en zonas áridas, Islas Canarias.

LEPPER, A.W.D., MATTHEWS, P.R.J. (1966): Experimental Mastitis Produced by *Pseudomonas aeruginosa* in Goats. *Res. Vet. Sci.*, **7:** 151-160.

LERONDELLE, C. (1984): Dènombrement cellulaire dans le lait de demi-mamelles de chèvre. *Goat disease. Int. colloquium*, Niort (France): 225-232.

LERONDELLE, C. (1984): Les infections mammaires de la chèvre. Les maladies de la chèvre, Niort (France). *Ed. INRA Publ.*, **28:** 219-224.

LERONDELLE, C., POUTREL, B. (1984): Characteristics of non-clinical mammary infections of goats. *Ann. Rech. Vét.*, **15 (1):** 105-112.

LINSCOTT, W.D., TRIGLIA, R.P. (1980): Methods for assaying nine complement components and C3b-inactivator. *Mol. Immunol.*, **17:** 729-740.

LINZELL, J.L., PEAKER, M. (1971): Intracellular concentrations of sodium, potassium, and chloride in the lactating mammary gland and their relation to the secretory mechanism. *J. Physiol.*, **216:** 683.

LINZELL, J.L., PEAKER, M. (1972): Day-to-day variations in milk composition in the goat and cow as a guide to the detection of subclinical mastitis. *Br. Vet.J.*, **128:** 284-294.

LINZELL, J.L., PEAKER, M. (1974): Changes in colostrum composition and in the permeability of the mammary epithelium at about the 4 time of parturition in the goat. *J. Physiol.*, **243:** 129.

LISOWSKI, J., JANUSZ, M., TYRAN, B., MORAWIECKI, A., GALOB, S., BIALKOWSKA, H. (1975): Immunoglobulins of colostrum. III. Comparative studies of ovine serum and colostrum IgG₁ and IgG₂. *Immunochemistry*, **12:** 159.

BIBLIOGRAFIA

LITTLE, T.W.A., HERBERT, C.N., FORBES, D. (1968): Electrical conductivity and the leukocyte count of bovine milk. *Vet. Rec.*, 82: 431-433.

LITTLE, R.D., PLASTRIDGE, W.N. (1946): Bovine Mastitis, A Symposium. McGraw-Hill, N.Y.: 193.

LOGAN, E.F., PENHALE, W.J., JONES, R.A. (1972): Changes in the serum immunoglobulin levels of colostrum-fed calves during the first 12 weeks postpartum. *Res. Vet. Sci.*, 14: 394-397.

LOWENSTEIN, M., SPECK, S.J., BARNHART, H.M., FRANK, J.F. (1980): Research on goat milk products: A review. *J. Dairy Sci.*, 63: 1631-1648.

LYSTER, R.L.J. (1972): Reviews of the progress of dairy science. Chemistry of milk proteins. *J. Dairy Sci.*, 39: 279.

MACDIARMID, S.C. (1978): Antibacterial drugs used against mastitis in cattle by the systemic route. *New Zealand Vet. J.*, 26: 290-295.

MACDIARMID, S.C. (1980): Drugs used in the antibacterial therapy of mastitis. Proceedings of a post-graduate short course. Palmerston North, new Zealand, Massey University: 103-110.

MACH, J.P., PAHUD, J.J. (1971): Secretory IgA, a major immunoglobulin in most bovine external secretions. *J. Immunol.*, 106: 552.

MACKENZIE, D.D.S., LASCELLES, A.K. (1968): The transfer of ¹³¹I-labelled immunoglobulins and serum albumin from blood into milk of lactating ewes. *Aust. J. Exp. Biol. Med. Sci.*, 46: 285.

MAISI, P. (1990a): Analysis of physiological changes in caprine milk with CMT, NAGase and antitrypsin. *Small Rum. Res.*, 3: 485-492.

MAISI, P. (1990b): Milk NAGase, CMT and antitrypsin as indicators of caprine subclinical mastitis infections. *Small Rum. Res.*, 3: 493-501.

MAISI, P., RIIPINEN, I. (1991): Pathogenicity of different species of staphylococci in caprine udder. *Br. Vet. J.*, 147: 126-132.

MALCOLM, J.F., KING, C.W., CAMPBELL, M.M. (1942): The value of the cell content and electrical conductivity of milk as criteria of bovine mastitis. *Proc. Soc. Agric. Bact. Engl.*: 30.

MALHOTRA, B.P., KAPUR, M.P. (1983): Radial-immunodiffusion test for the diagnosis of bovine subclinical mastitis. *J. Exp. Biol.*, 21: 81-83.

BIBLIOGRAFIA

MALLARD, B., BURNSIDE, E.B., BURTON, J.H., WILKIE, B. (1983): Immunoglobulin variation in canadian Holstein-Friesians. *J. Dairy Sci.*, **66**: 862.

MANCINI, G., CARBONARA, A.O., HEREMANS, J.F. (1965): Immunochemical quantitation of antigens by single radial immunodiffusion. *Immunochemistry*, **2**: 235.

MANSER, P.A. (1985): Mastitis in goats. *Goat Vet. Soc. J.*, **6**, (1).

MANSER, P.A. (1986): Prevalence, causes and laboratory diagnosis of subclinical mastitis in the goat. *Vet. Rec.*, **118**: 552-554.

MATHISON, B.A., KELLEY, K.W., DAVIS, W.C. (1984): Quantitation of bovine immunoglobulin G2 antibodies binding *Staphylococcus aureus*, using a murine monoclonal antibody. *Am. J. Vet. Res.*, **45** (12): 2518-2523.

MATTLA, T. (1985): Diagnostic problems in bovine mastitis. Academic dissertation. College of Veterinary Medicine, Helsinki.

MAYER, S.J., BOURNE, F.J. (1988): Effect of pH changes on the killing of *Staphylococcus aureus* and other mastitis pathogens by bovine neutrophil granule extracts. *Res. Vet. Sci.*, **44**: 324-328.

MAYER, S.J., CRAVEN, N., KEEN, P.M., BOURNE, F.J. (1986): Variation in susceptibility of mastitis pathogens to killing by bovine neutrophil granule proteins. Proceedings Fourteenth World Congress of Disease of Cattle, **2**: 1105-1110.

MAZENGERA, K.E., KENNEDY, B.W., BURNSIDE, E.B., WILKIE, B.N., BURTON, J.H. (1985): Genetic parameters of bovine serum immunoglobulins. *J. Dairy Sci.*, **68**: 2309.

McCUISTON, W.R. (1960): Prevent mastitis with aridity. *Dairy Goat J.*, **38**: 1-3.

McDONALD, J.S. (1975): Radiographic method for anatomic study of the teat canal: Characteristics related to resistance to new intramammary infection during lactation and the early dry period. *Cornell Vet.*, **65**: 492.

McDONALD, J.S., ANDERSON, A.J. (1981): Total and differential somatic cell counts in secretions from noninfected bovine mammary gland: The early nonlactating period. *Am. J. Vet. Res.* **42**:1360.

McDONALD, J.S., ANDERSON, A.J. (1981): Total and differential somatic cell counts in secretions from noninfected bovine mammary gland: The peripartum period. *Am. J. Vet. Res.* **42**:1366.

BIBLIOGRAFIA

- McDOWELL, G.H., LASCELLES, A.K. (1969):** Local production of antibody by ovine mammary glands infused with Salmonella flagellar antigens. *Aust. J. Exp. Biol. Med. Sci.*, **47**: 669-678.
- McDOWELL, G.H., LASCELLES, A.K. (1971):** Local production of antibody by the lactating mammary gland of the ewe and the effect of systemic immunization. *Res. Vet. Sci.*, **12**: 113.
- McDOWELL, G.H. (1973):** Local antigenic stimulation of guinea-pig mammary gland. *Aust. J. Exp. Biol. Med. Sci.*, **51**: 237.
- McDOWELL, G.H., WATSON, D.L. (1974):** Immunity to experimental staphylococcal mastitis: comparison of local and systemic immunisation. *Aust. Vet. J.*, **50**: 533-536.
- McDOWELL, R.E., McDANIEL, B.T. (1968):** Interbreed matings in dairy cattle. II. Herd health and viability. *J. Dairy Sci.*, **51**: 1275.
- McWILLIAMS, M., PHILLIPS-QUAGLIATA, J.M., LAMM, M.E. (1975):** Characteristics of mesenteric lymph node cells homing to gut-associated lymphoid tissue in syngeneic mice. *J. Immunol.*, **115**: 54-58.
- MELLENBERGER, R. (1979):** Somatic cell in goat's milk. *Proc. Annu. Meet. Natl. Mastitis Counc.*, **18**: 41-43.
- MELLY, M.A., KUKE, L.J., LIAU, D.F., HASH, J.H. (1974):** Biological properties of the encapsulated *Staphylococcus aureus* M. *Infect. Immun.*, **10**: 389.
- MILLER, G.E., BANERJEE, N.C., STOWE, C.M. (1967):** Diffusion of certain weak organic acids and bases across the bovine mammary gland membrane after systemic administration. *J. Pharm. Therap.*, **157**: 245-253.
- MILLER, G.Y., BARLETT, P.C. (1991):** Economic effects of mastitis prevention strategies for dairy producers. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, **198**: 227-231.
- MILLER, G.Y., DORN, C.R. (1990):** Costs of dairy cattle diseases to producers in Ohio. *Prev. Vet. Med.*, **8**: 171-182.
- MILLER, R.H., EMANUELSON, U., PERSSON, E. (1983):** Relationships of milk somatic cell counts to daily milk yield and composition. *Acta Agric. Scand*, **33**: 209-223.
- MOL, H. (1975):** Antibiotics and milk. A.A. Balkema, Rotterdam.
- MONTGOMERY, P.C., ROSNER, B.R., COHN, J. (1974):** The secretory antibody response. Anti-DNP antibodies induced by dinitrophenylated type III Pneumococcus. *Immun. Commun.*, **3**: 143.

BIBLIOGRAFIA

- MOORE, G.A., HEIDER, L.E. (1984):** Tratment of Mastitis. *Vet. Clin. N. Am.: Large An. Prac.*, **6** (2): 323-333.
- MUDD, S. (1970):** Infectious Agents and Host Reactions. Ed. S. Mudd. Philadelphia, W.B. Saunders: 220.
- MUELLER, R., CARROLL, E.J., PANICO, L. (1983):** Hemolytic complement titers and complement C3 levels in endotoxin-induced mastitis. *Am. J. Vet. Res.*, **44** (8): 144-1445.
- MUKHERJEE, A., DAS, M.S. (1958):** Etiology of clinical forms of goats mastitis in west Bengal. *Indian Vet. J.*, **34**: 339-341.
- MULCAHY, G., QUINN, P.F. (1986):** A review of immunomodulators and their application in veterinary medicine. *J. Vet. Pharmacol. Therapy*, **9**: 119-139.
- MUNCH-PETERSON, E. (1968):** Incidence of udder infections arising at various stages of lactation of cows. *Aust. Vet. J.*, **44**: 543.
- MURPHY, F.A., AALUND, O., OSEHOLD, J.W., CARROLL, E.J. (1964):** Gamma globulins of bovine lacteal secretions. *Arch. Biochem. Biophys.*, **108**: 230.
- MURPHY, J.M., HANSON, J.J. (1941):** A modified Whiteside Test for the detection of chronic bovine mastitis. *Cornell Vet.*, **31**: 1947.
- NAIDU, T.L.G., NEWBOLD, F.H.S. (1973):** Glycogen in leukocytes from bovine blood and milk. *Canad. J. Comp. Med.*, **37**: 47.
- NANSEN, P. (1972):** Selective immunoglobulin deficiencies in cattle and susceptibility to infection. *Acta Pathol. Microbiol. Scand.*, **80**: 49.
- NATIONAL MASTITIS COUNCIL (1987):** Current concepts of bovine mastitis, 3rd ed., Arlington.
- NATZKE, R.P., EVERETT, R.W., GUTHRIE, R.S. (1972):** Mastitis control program: effect on milk production. *J. Dairy Sci.*, **55**: 1256-1260.
- NESBAKKEN, T. (1976):** The cell count in milk of goats. *Nord. Vet. Med.*, **28**: 550-556.
- NESBAKKEN, T. (1978):** The cell count in milk of goats and the diagnosis of mastitis in goats. *Nord. Vet. Med.*, **30**: 21-23.
- NEWBOULD, F.H.S. (1970):** Enhancement of phagocytosis in bovine milk leukocytes in vitro. *Ca. J. Comp. Med.*, **34**: 261-264.

BIBLIOGRAFIA

- NEWBOULD, F.H.S. (1973):** The effects of added serum and glucose, and some inherent factors, on phagocytosis in vitro by milk leukocytes from several cows. *Can. J. Comp. Med.*, **37**: 189-194.
- NEWBOULD, F.H.S. (1976):** Phagocytic activity of bovine leukocytes during pregnancy. *Can. J. Comp. Med.*, **40**: 111.
- NEWBOULD, F.H.S. (1975):** A technique for differential somatic cell counts in milk. *Ann. Bull. Intern. Dairy Fed.*, **85**: 136-141.
- NEWBY, F.J., BOURNE, J. (1977):** The nature of the local immune system of the bovine mammary gland. *J. Immunol.*, **118**: 461.
- NEWBY, T.J., STOKES, C.R., BOURNE, F.J. (1982):** Immunological activities of milk. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, **3**: 67-94.
- NICKERSON, S.C. (1987):** Resistance mechanisms of the bovine udder: new implications for mastitis control at the teat end. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, **191**: 1484.
- NICKERSON, S.C., BODDIE, R.L., (1985):** Method of intramammary drug infusion may be important. *Hoard's Dairyman*, **130**: 1175.
- NICKERSON, S.C., PAAPE, M.J., DULIN, A.M. (1985):** Effect of antibiotics on bovine milk leukocyte phagocytosis, viability, and ultrastructure in vitro. *Am. J. Vet. Res.*, **46**: 2259.
- NICKERSON, S.C., PANKEY, J.W. (1985):** Electron microscopic study of leucocytic infiltration of the mammary teat duct during infection with *Staphylococcus aureus*. *Res. Vet. Sci.*, **38**: 167-173.
- NIEMIALTOWSKI, M., NONNECKE, B.J., TARGOWSKI, S.P. (1988):** Phagocytic activity of milk leukocytes during chronic staphylococcal mastitis. *J. Dairy Sci.*, **71**: 780-787.
- NONNECKE, B.J., HARP, J.A. (1985):** Effect of chronic staphylococcal mastitis on the mitogenic responses of bovine lymphocytes. *J. Dairy Sci.*, **68**: 3323.
- NORCROSS, N.L. (1977):** Immune response of the mammary gland and role of immunization in mastitis control. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, **170**: 1228-1231.
- NORCROSS, N.L., STARK, D.M. (1970):** Immunity to mastitis: a review. *J. Dairy Sci.*, **53**: 387.
- NORTH, R.J. (1978):** Opinions. The concept of the activated macrophage. *J. Immunol.*, **121**: 806.

BIBLIOGRAFIA

- O'BRIEN, J.K. (1982): Some aspects of mastitis control in goats. *Goat Vet. J.*, 3 (1): 13-17.
- OGRA, S.S., WEINSTRaub, D., AGRA, P.L. (1977): Immunologic aspects of human colostrum and milk. III. Fate and absorption of cellular and soluble components in the gastrointestinal tract of the newborn. *J. Immunol.*, 119: 245.
- OKADA, M. (1960): Histology of the mammary gland. VII. Histological and histochemical studies of cells in the milk of domestic animals. *Tohokee J. Agric. Res.*, 11: 31-51.
- OLIVER, J., DODD, F.H. (1956): Variations in the incidence of udder infection and mastitis with stage of lactation, age, and season of the year. *J. Dairy Res.*, 23: 181.
- OLIVER, S.P. (1988): Influence of parity on intramammary infections by environmental mastitis pathogens during the dry period. *Agri-Pract. Dis. Control*, 9 (6): 7-14.
- OLSON, D.P., WOODARD, L.F., BULL, R.C., EVERSON, D.O. (1981): Immunoglobulin levels in serum and colostrum whey of protein-metabolisable energy restricted beef cows. *Res. Vet. Sci.*, 30: 49-52.
- OPDEBEECK, J.P. (1982): Mammary gland immunity. *J. Am. Vet. Assoc.*, 181: 1061-1065.
- OSHIMA, M. (1978): Physiological significance of variation in the electrolyte concentration in cow's milk. En "Physiology of mammary glands". *Jpn. Sci. Soc. Press, Tokyo*. Edit. A. Yokoyama, H. Mizuno and H. Nagasawa: 363-380.
- OSLER, A.G. (1976): Complement mechanisms and functions. *Prentice-Hall, Inc, Englewood Cliffs, NJ*: 107.
- OUTTERIDGE, P.M., LASCELLES, A.K. (1967): Local immunity in the lactating mammary gland following the infusion of staphylococcal toxoids. *Res. Vet. Sci.*, 8: 313-320.
- OUTTERIDGE, P.M., MACKENZIE, D.D.S., LASCELLES, A.K. (1968): The distribution of specific antibody among the immunoglobulins in whey from the locally immunized gland. *Arch. Biochem. and Biophys.*, 126: 105.
- PAAPE, M.J., DULIN, A., WERGIN, W.P., GUIDRY, A.J., WEINLAND, B.T. (1980a): Differentiation and enumeration of somatic cells in goat milk. *J. Dairy Sci.*, 63: (suppl. 1) 123.
- PAAPE, M.J., GUIDRY, A.J. (1977): Effect of fat and casein on intracellular killing of *Staphylococcus aureus* by milk leukocytes. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 155: 550-593.
- PAAPE, M.J., GUIDRY, A.J., KIRK, S.T., BOLT, D.J. (1975): Measurement of phagocytosis of ³²P-labeled *Staphylococcus aureus* by bovine leukocytes: Lysostaphin digestion and inhibitory effect of cream. *Am. J. Vet. Res.*, 36: 1737-1743.

BIBLIOGRAFIA

- PAAPE, M.J., PEARSON, R.E., WERGIN, W.P., GUIDRY, A.J. (1977):** Enhancement of chemotactic response of polymorphonuclear leukocytes into the mammary gland and isolation from milk. *J. Dairy Sci.*, **60**: 53-62.
- PAAPE, M.J., SCHULTZE, W.D., GUIDRY, A.J., KORTUM, W.M., WEINLAND, B.T. (1981):** Effect of an intramammary polyethylene device on the concentration of leukocytes and immunoglobulins in milk and on the leukocyte response to *Escherichia coli* endotoxin and challenge exposure with *Staphylococcus aureus*. *Am. J. Vet. Res.*, **42**: 774-783.
- PAAPE, M.J., TUCKER, H.A., HAFS, H.D. (1964):** Comparison of methods for estimating milk somatic cells. J. Article 3468 from Michigan Agricultural Experiment Station: 191-196.
- PAAPE, M.J., WERGIN, W.P. (1977a):** The leukocyte as a defense mechanism. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, **170**: 1214-1223.
- PAAPE, M.J., WERGIN, W.P. (1977a):** Scanning and transmission electron microscopy of polymorphonuclear leukocytes (PMN) isolated from milk. *Fed. Pro.*, **36**: 1201.
- PAAPE, M.J., WERGIN, W.P., GUIDRY, A.J., PEARSON, R.E. (1979):** Leukocytes-second line of defense against invading mastitis pathogens. *J. Dairy Sci.*, **62**: 135-153.
- PAAPE, M.J., WERGIN, W.P., GUIDRY, A.J., SCHULTZE, W.D. (1980b):** Phagocytic defense of the ruminant mammary gland. *Adv. Exp. Med. Biol.* **137**: 555.
- PADGETT, G.A., HIRSCH, J.G. (1967):** Lysozyme. Its absence in tears and leukocytes of cattle. *Australian J. Exp. Biol. Med. Sci.*, **45**: 569.
- PANG, A.S.D., ASTON, W.P. (1977):** Alternative complement pathway in bovine serum: Lysis of human erythrocytes. *Am. J. Vet. Res.*, **38**: 355-359.
- PANKEY, J.W. (1986):** Better udder health: Why treatment doesn't always work. *Hoard's Dairyman*, **10**: 721.
- PANKEY, J.W., BODDIE, N.T., WATTS, J.L., NICKERSON, S.C. (1985):** Evaluation of protein A and a commercial bacterin as vaccines against *Staphylococcus aureus* mastitis by experimental challenge. *J. Dairy Sci.*, **68**: 726-731.
- PARK, Y.W. (1991):** Interrelationships between somatic cell counts, electrical conductivity, bacteria counts, percent fat and protein in goat milk. *Small Ruminant Research*, **5**: 367-375.
- PARK, Y.W., HUMPHREY, R.D. (1986):** Bacterial cell counts in goat milk and their correlations with somatic cell counts, percent fat, and protein. *J. Dairy Sci.*, **69**: 32-37.
- PARK, Y.W., NUTI, L.C. (1985):** Electrical conductivity of goat milk in evaluating subclinical mastitis. Proc. 3rd AAAP Animal Sci. Congr., Korea, **2**: 1272-1274.

BIBLIOGRAFIA

- PARMELY, M.J., BEER, A.E. (1977):** Colostral cell-mediated immunity and the concept of a common secretory immune system. *J. Dairy Sci.*, **60**: 655.
- PEAKER, M., LINZELL, J.L. (1973):** Changes in milk composition preceding oestrus in the goat: comparison with the effects of exogenous oestrogens. *J. Endocrinol.*, **59**: xvii.
- PEARSON, J.K.L., WRIGHT, C.L., GREER, D.O. (1970):** A study of methods for estimating the cell content of bulk-milk. *J. Dairy Res.*, **37**: 467-480.
- PEARSON, J.K.L., MACKIE, D.P. (1979):** Factors associated with the occurrence, cause and outcome of clinical mastitis in dairy cattle. *Vet. Rec.*, **105**: 456-463.
- PEREZ, M., SCHULTZ, L.H. (1979):** Somatic cells in goat milk. *Proc. Annu. Meet. Natl. Mastitis Council.*, **18**: 44-49.
- PERNTHANER, A., DEUTZ, A., SCHLERKA, G., BAUMGARTNER, W. (1991):** The cell count in sheep and goat milk. *Tierarztl Prax.*, **19** (6): 612-616.
- PETERSEN, W.E., CAMPBELL, B. (1955):** Use of protective principles in milk and colostrum in prevention of disease in man and animals. *Lancet*, **75**: 494-496.
- PETERSON, P.K., WILKINSON, B.J., KIM, Y., SCHMELING, D., QUIE, P.G. (1978):** Influence of encapsulation on *Staphylococcal* opsonization and phagocytosis by human polymorphonuclear leukocytes. *Infect. Immun.*, **19**: 943.
- PETTERSEN, K.E. (1981):** Cell content in goat's milk. *Acta Vet. Scand.*, **22**: 226-237.
- PHILPOT, W.N., PANKEY, J.W. (1973):** Comparison of four methods for enumerating somatic cells in milk with an electronic counter. *J. Milk Food Technol.*, **36** (2): 94-100.
- PHILPOT, W.N. (1979):** Control of mastitis by hygiene and therapy. *J. Dairy Sci.*, **62**: 168-176.
- PHIPPS, L.W., NEWBOULD, F.H.S. (1966):** Determination of leukocyte concentrations in cow's milk with a Coulter-Counter. *J. Dairy Res.*, **33**: 51-64.
- PHIPPS, L.W. (1968):** Electronic counting of cells in milk: examination of a chemical treatment of dispersal of fat. *J. Dairy Res.*, **35**: 293-302.
- PIERCE, N.F., GOWANS, J.L. (1975):** Cellular kinetics of the intestinal immune response to Cholera toxoid in rats. *J. Exp. Med.*, **142**:1550.
- PITELKA, D.R. (1978):** Cell contacts in the mammary gland. En "Lactation: A comprehensive treatise". B.L. Larson (ed.), *Academic Press*, New York, **4**: 41.

BIBLIOGRAFIA

- PLATONOW, I., BLOBEL, H. (1963):** Therapeutic failures in chronic staphylococcal mastitis. *J. Vet. Med. Assoc.*, **142**: 1097-1101.
- PLOMMET, M. (1968):** The origin of milk antibodies. *Ann. Biol. Anim. Biochim. Biophys*, **8**: 407.
- PLOMMET, M. (1974):** Mammites et traite mécanique. *Ann. Zootechn.*: 87-95.
- PLOMMET, M., LE LOUDEC, C. (1975):** The role of antibiotic therapy during lactation in control of subclinical and clinical mastitis. *Proc. Int. Dairy Fed. Seminar on Mastitis Control*. Ed. F.H. Dodd, T.K. Griffen & R.G. Kingwill. Bull. Doc. **85**, Square Vergote 41, Brussels, Belgium: 265-281.
- PORTE, P. (1972):** Immunoglobulins in bovine mammary secretions. Quantitative changes in early lactation and absorption by the neonatal calf. *Immun.*, **23** (2): 225-238.
- PORTER, R.M. (1968):** Anti-O antibody titre in colostrum serum from cows infused prepartum with *Salmonella pullorum*-H. *J. Dairy Res.*, **35**: 7.
- POUTREL, B. (1984):** Staphylococcus sciuri subsp lentus associated with goat mastitis. *Am. J. Vet. Res.*, **45** (10): 2084-2085.
- POUTREL, B. (1984):** Udder infection of goats by coagulase-negative staphylococci. *Vet. Microb.*, **9**: 131-137.
- POUTREL, B., CAFFIN, J.P., RAINARD, P. (1983):** Physiological and pathological factors influencing bovine serum albumin content in milk. *J. Dairy Sci.*, **66**: 535.
- POUTREL, B., LERONDELLE, C. (1983):** Cell Content of Goat Milk: California Mastitis Test, Coulter Counter, and Fossomatic for Predicting Half Infection. *J. Dairy Sci.*, **66**: 2575-2579.
- POUTREL, B., LERONDELLE, C., DUCELLIEZ, M., BOIVIN, R. (1983):** Diagnostic des infections mammaires de la chevre a partir du denombrement cellulaire realise avec le Coulter Counter et le Fossomatic. *III Symp. Int. de ordeño mecánico en peq. rumiantes*, Valladolid (España): 551-558.
- POUTREL, B., RAINARD, P. (1982):** Predicting the probability of quarter infection (by major pathogens) from somatic cell concentration. *Am. J. Vet. Res.*, **43**: 1296.
- POUTREL, B., SERIEYS, F., DUCELLIEZ, M. (1990):** Efficacy of a germicidal post milking barrier-type teat dip in preventing intramammary infections. *Vet. Rec.*, **126**: 638-640.

BIBLIOGRAFIA

PRESCOTT, S.C., BREED, R.S. (1910): The determination of the number of body cells in milk by direct methods. *J. infect. Dis.*, 7: 632-640.

RAEVORY, M., KOIRANEN, L. (1979): *Bacillus cereus* as a cause of mastitis and its occurrence in milk products. *Dairy Sci. Abstr.*, 41: 1028.

RAUBERTAS, R.F., SHOOK, G.E. (1982): Relationship between lactation measures of somatic cell concentration and milk yield. *J. Dairy Sci.*, 65: 419.

READ, R.B., REYERS, A.L., BRADSHAW, J.G., PHILPP, J.T. (1967): Electronic counting of somatic cells in milk. *J. Dairy Sci.*, 50: 669-674.

REITER, B. (1976): Inhibition and Inactivation of Vegetative Microbes, *Academic Press*, London: 31-60.

REITER, B. (1978): Review of the progress of Dairy Science: antimicrobial systems in milk. *J. Dairy Res.*, 45: 132-147.

REITER, B., BRAMLEY, A.J. (1975): Defense mechanisms of the udder and their relevance to mastitis control. En *Proceed. Seminar on Mastitis Control*. Editado por Dodd, f.h., Griffin, T.K., Kingwill, R.G.. College of Estate Management, Reading, England, *Bull.* 85: 210.

ROBINSON, T.C. (1980): Therapy for acute and peracute mastitis. *Mastitis Control and Herd Management. Tec. Bull. 4, Nat. Inst. Res. in Dairying*, England: 128-134.

ROGERS, H.J., SYNGE, C. (1978): Bacteriostatic effect of human milk on *Escherichia coli*: the role of IgA. *Immunology*, 34: 19-28.

ROGUINSKY, M., POUTREL, B., SECQ, J.P., PILLET, R. (1980): Etude cellulaire et bactériologique sur les laits de troupeau de chèvres. *Le Lait*, 60: 27-32.

ROGUINSKY, M., REDON, J.F., LE MENS, P., GENDRON, H., ALLARD, P. (1971): Causes et diagnostic des mammites de la chèvre. *Chèvre*, 68: 4-5.

ROUX, M.E., McWILLIAMS, M., PHILLIPS-QUAGLIATA, J.M. (1977): Origin of IgA-secreting plasma cells in the mammary gland. *J. Exp. Med.*, 146: 1311-1322.

ROWE, D., GROB, R., ANDERSON, S.G. (1972): An international reference preparation of human immunoglobulins G, A and M-content of immunoglobulins by weight. *Bull. W. H. O.*, 46: 67.

RUHNKE, H.L., ROSENDAL, S., GOLTZ, J. (1983): Isolation of *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* from polyarthritis and mastitis of goats in Canada. *Can. Vet. J.*, 24: 54-56.

BIBLIOGRAFIA

- RUSSELL, M.W., BROOKER, B.E., REITER, R. (1976):** Inhibition of the bactericidal activity of bovine polymorphonuclear leukocytes and related systems by casein. *Res. Vet. Sci.*, **20**: 30-35.
- RUSSELL, M.W., BROOKER, B.E., REITER, R. (1977):** Electron microscopic observations of the interaction of casein micelles and milk fat globules with bovine polymorphonuclear leukocytes during the phagocytosis of staphylococci in milk. *J. Comp. Pathol.*, **87**: 43-52.
- RUSSELL, M.W., REITER, B. (1975):** Phagocytic deficiency of bovine milk leukocytes: An effect of casein. *J. Reticuloendothel. Soc.*, **18**: 1-13.
- RYAN, D.P., GREENWOOD, P.L., NICHOLLS, P.J. (1993):** Effect of caprine arthritis-encephalitis virus infection on milk cell. *J. Dairy Res.*, **299-306**.
- SAMSON, R.R., MIRTLE, C., McCLELLAND, D.B.L. (1979):** Secretory IgA does not enhance the bacteriostatic effects of iron-binding or vitamin B₁₂-binding proteins in human colostrum. *Immunology*, **38**: 367-373.
- SANDERSON, C.J. (1966):** The treatment of mastitis with intramammary infusions. *Austr. Vet. J.*, **42**: 47-53.
- SASAKI, M., DAVIS, C.L., LARSON, B.L. (1976):** Production and turnover of IgG₁ and IgI₂ immunoglobulins in the bovine around parturition. *J. Dairy Sci.*, **59**: 2046-2055.
- SASAKI, M., LARSON, B.L., NELSON, D.R. (1977):** Kinetic analysis of the binding of immunoglobulins IgG₁ and IgG₂ to bovine mammary cells. *Biochim. Biophys. Acta*, **497**: 160.
- SAVAGE, D.C. (1972):** Survival on mucosal epithelia, epithelial penetration and growth in tissues of pathogenic bacteria. En Smith H., Pearce J.H. (ed.): *Microbial Pathogenicity in Man and Animals*. London, *University Press*: 25-28.
- SCHALM, B.W., JAIN, N.C., CARROLL, E.J. (1975):** Veterinary hematology. 3^a ed. *Lea and Febiger, Philadelphia, PA*: 689.
- SCHALM, O.W. (1977):** Pathologic changes in the milk and udder of cows with mastitis. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, **170**: 1137.
- SCHALM, O.W., CARROLL, E.J., JAIN, N.C. (1971):** Bovine mastitis. *Lea and Febiger, Philadelphia, PA*: 94.
- SCHALM, O.W., GRAY, D.M., NOORLANDER, D.O. (1955):** Procedures for the use of the Whiteside Test on Milk in the laboratory or Barn. *North Am. Vet.*, **36**: 1011.

BIBLIOGRAFIA

- SCHALM, O.W., LASMANIS, J., CARROLL, E.J. (1964):** Effects of pre-existing leukocytosis on experimental coliform (*Aerobacter aerogenes*) mastitis in cattle. *Am. J. Vet. Res.*, **25**, 104.
- SCHALM, O.W., NOORLANDER, D.O. (1957):** Experiments and observations leading to development of the California Mastitis Test. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, **130** (5): 199-204.
- SCHOEFL, G.L., LASCELLES, A.K. (1974):** Passage of proteins across the epithelium of the mammary gland in lactating mice. *8th Inter. Congr. Electron Microscopy, Camberra*. **11**: 466.
- SCHREUDER, B.E.C., TER LAAK, E.A., DE GEE, A.L. (1990):** *Corynebacterium pseudotuberculosis* in milk of CL affected goats. *Vet. Rec.*, **13**: 387.
- SCHULTZ, L.H. (1977):** Somatic cell counting of milk in production testing programs as a mastitis control technique. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, **170**: 1244.
- SCHULTZ, L.H. (1977):** Somatic cells in milk-physiological aspects and relationships to amount and composition of milk. *J. Food Prot.*, **40**: 125.
- SCHULTZ, L.H. (1977):** Current Concepts of Bovine Mastitis. National Mastitis Council, Inc., Washington, D.C.:9.
- SELSTED, M.E., SZKLAREK, D., LEHRER, R.I. (1981):** Purification and antibacterial activity of antimicrobial peptides of rabbit granulocytes. *Infect. Immun.*, **45**: 150.
- SENF, B., NEUDECKER, J. (1991):** Defense mechanisms of the bovine mammary gland. *Tierarztl Prax.*, **19** (4): 357-363.
- SHELDRAKE, R.F., HOARE, R.J.T., WOODHOUSE, V.E. (1981):** Relationship of somatic cell count and cell volume analysis of goat's milk to intramammary infection with coagulase-negative staphylococci. *J. Dairy Res.*, **48**: 393-403.
- SHELDRAKE, R.F., HUSBAND, A.J., WATSON, D.L. (1985):** Specific antibody-containing cells in the mammary gland of non-lactating sheep after intraperitoneal and intramammary immunisation. *Res. Vet. Sci.*, **38**: 312-316.
- SHIN, H.S., SNYDERMAN, R., FRIEDMAN, A., MELLORS, A., MAYER, M.M. (1968):** Chemotactic and anaphylatoxic fragment cleaved from the fifth component of guinea pig complement. *Science*, **162**: 361.
- SHOUMAN, M.T., REZK, M.S.H., ISMALL, M., EL-GED, A. (1986):** The role of Streptococci and Corynebacteria in the subclinical and clinical mastitis in she-goats and ewes. *Assiut Vet. Med.*, **16** (31): 341-351.

BIBLIOGRAFIA

SIERRA, D., CORRALES, J.C., MARCO, J.C., CONTRERAS, A., (1992): Aproximación al umbral fisiológico de células somáticas en leche de cabras murciano-granadinas. *XVII Jornadas Científicas de la SEOC*, Salamanca (España).

SILVERSTEIN, S., STEINMAN, R.M., COHN, Z.A. (1977): Endocytosis. *Ann. Rev. Biochem.*, 46: 669.

SJOQVIST, E., BORGA, O., ORME, M.L. (1976): Fundamentals of clinical pharmacology. Drug Treatment. Ed. G.S. Avery, Sydney, Australia, Adis Press: 1-42.

SMITH, J. W., SCHULTZ, R.D. (1977): Mitogen- and antigen-responsive milk lymphocytes. *Cell. Immunol.*, 29: 165.

SMITH, K.L., CONRAD, H.R., PORTER, R.M. (1971): Lactoferrin and IgG immunoglobulin from involuted bovine mammary glands. *J. Dairy Sci.*, 54: 1427.

SMITH, K.L., MUIR, L.A., FERGUSON, L.C., CONRAD, H.R. (1972): Selective transport of IgG₁ into the mammary gland: role of estrogen and progesterone. *J. Dairy Sci.*, 54: 1886-1894.

SMITH, M.C., ROGUINSKY, M. (1977): Mastitis and other diseases of the goat's udder. *J. Am. Vet. Assoc.*, 171 (12): 1241-1248.

SMITH, K.L., SCHANBACHER, F.L. (1977): Lactoferrin as a factor of resistance to infection of the bovine mammary gland. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, 170: 1224-1227.

SMITH, K.L., TODHUNTER, D.A., SCHOENBERGER, P.S. (1985): Environmental Mastitis: Cause, Prevalence, Prevention. *J. Dairy Sci.*, 68: 1531-1553.

SMITH, K.L., TODHUNTER, D.A., SCHOENBERGER, P.S. (1985): Environmental pathogens and intramammary infection during the dry period. *J. Dairy Sci.*, 68: 402.

SMITH, M.C., CUTLIP, R. (1988): Effects of infection with caprine arthritis-encephalitis virus on milk production in goats. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, 193 (1): 63-67.

SMITH, W.D., DAWSON, McL., WELLS, P.W., BURRELLS, C. (1975): Immunoglobulin concentrations in ovine body fluids. *Res. Vet. Sci.*, 19: 189-194.

SNEATH, P.H.A., MAIR, N.S., SHARPE, M.E., HOLT, J.G. (1984): *En Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* (P.H., Sneath, N.S., Mair, M.E., Sharpe and J.B., Holt. Eds.) Edit. Williams & Wilkins. Baltimore. Vol.II.

SNYDERMAN, R., GOETZL, E.J. (1981): Molecular and cellular mechanisms of leukocyte chemotaxis. *Science*, 213: 830.

BIBLIOGRAFIA

SOCKEN, D.J., JEEJEEBHOY, K.N., BAZIN, H., UNDERDOWN, B.J. (1979): Indentification of secretory component as an IgA receptor on rat hepatocytes. *J. Exp. Med.*, **150**: 1538-1548.

SOKAL, R.R., ROHLF, F.J. (1980): Introducción a la bioestadística. Editado por W.H. Freeman and Company. Ed. Reverté, S.A., Barcelona.

SPIEGELBERG, H.L. (1974): Biological activities of immunoglobulins of different classes and subclasses. *Adv. Immunol.*, **19**: 259.

STALEY, J.T., BRYANT, M.P., PFENNING, N., HOLT, J.G. (1984): En Bergey's Manual of Systematic Bacteriology (P.H., Sneath, N.S., Mair, M.E., Sharpe and J.B., Holt. Eds.) *Edit. Williams & Wilkins*. Baltimore. Vol.III.

STEINBERG, E.M., WEDNER, J.H., LEUNG, M.K., PARKER, C.W. (1987): Effect of serotonin (5HT) and other monamines on murine macrophages: Modulation of interferon gamma induced phagocytosis. *J. Immunol.*, **138**: 4360-4365.

STEPHENS, S., DOLBY, J.M., MONTREUIL, J. (1980): Differences in inhibition of the growth of commensal and enteropathogenic strains of *Escherichia coli* by lactotransferrin and secretory immunoglobulin A isolated from human milk. *Immunology*, **41**: 597-603.

SWABRICK, O. (1966): The use of parenteral erythromycin in the treatment of bovine mastitis. *Vet. Rec.*, **79**: 508-512.

TARGOWSKI, S.P. (1983): Role of immune factors in protection of mammary gland. *J. Dairy Sci.*, **66**: 1781-1789.

TARGOWSKY, S.P., BERMAN, D.T. (1975): Leukocytic response of bovine mammary gland to infection of killed cells and cell walls os *Staphylococcus aureus*. *Am. J. Vet. Res.* **36**: 1561.

TARGOWSKY, S.P., BERMAN, D.T. (1976): Multiplication of staphylococci in vitro in normal and mastic milk from vaccinated and nonvaccinated cows. *Am. J. Vet. Res.* **37**: 1297.

TARGOWSKY, S.P., KLUCINSKI, W., NONNECKE, B.J. (1982): Fc receptors on milk leukocytes. *Fed. Proc.*, **12**: 558.

TARGOWSKY, S.P., NONNECKE, B.J. (1982): Cell-mediated immune response of the mammary gland in guinea pigs. I. Effect of antigen injection into the vaccinated and unvaccinated glands. *Am. J. Rep. Immunol.* **2**: 29.

THORNTON, D.A.K. (1983): Diseases of the mammary gland in goats. *Goat Vet. Soc. J.*, **4** (1): 9-13.

BIBLIOGRAFIA

- THRUSFIELD, M. (1990):** Naturaleza de los datos. En *Epidemiología Veterinaria*. Ed. *Acribia*, S.A.: 127-141.
- TOLLE, A., ZEIDER, H., HEESCHEN, W. (1966):** Ein Verfahren zur elektronischen Zählung von Milchzellen. (A method for electronic counting of milk cells). *Michwissenschaft*, **21**: 93-98.
- TRIGLIA, R.P., LINSKOTT, W.D. (1980):** Titers of nine complement components, conglutinin and C3b-inactivator in adult and fetal bovine sera. *Mol. Immunol.*, **17**: 741-748.
- TUCKER, H.A. (1981):** Physiological control of mammary growth, lactogenesis, and lactation. *J. Dairy Sci.*, **64**: 1403.
- ULBERG, S. (1964):** Studies on the distribution and fate of S³⁵-labelled benzylpenicillin in the body. *Acta Rad. Supp.*: 118.
- ULBERG, S., HANSON, E., FUNKE, H. (1958):** Distribution of penicillin in mastitic udders following intramammary injection - an autoradiographic study. *Am. J. Vet. Res.*, **19**: 84-92.
- UNKELESS, J.C., EISEN, H.N. (1975):** Binding of monomeric immunoglobulins to Fc receptors of mouse macrophages. *J. Exp. Med.*, **142**: 1520.
- VAERMAN, J.P. (1970):** Studies on IgA immunoglobulins in man and animals. Thesis, Université Catholique. (Sintal-Louvain: Belgium).
- VERBRUGH, H.A., VAN DIJK, W.C., PETERS, R., VanERNE, M.E., DAHA, M.R., PETERSON, P.K., VERHOEF, J. (1980):** Opsonic recognition of staphylococci mediated by cell wall peptidoglycan: Antibody-independent activation of human complement and opsonic activity of peptidoglycan. *J. Immunol.*, **124**: 1167.
- VERHOEF, J., PETERSON, P.K., QUIE, P.G. (1977):** Human polymorphonuclear leucocyte reports for staphylococcal opsonins. *Immunology*. **33**: 231.
- VILJOEN, M.H. (1974):** The isolation and identification of an antigen for the diagnosis of bovine mastitis by radial immunodiffusion. *Onderstepoort J. Vet. Res.*, **41** (3): 93-96.
- WARD, P.A. (1983):** Role of toxic oxygen products from phagocytic cells in tissue injury. *Adv. Shock. Res.*, **10**: 27-34.
- WATSON, D.L. (1975):** Cytophilic attachment of ovine IgG₂ to autologous polymorphonuclear leucocytes. *Aust. J. Exp. Biol. Med. Sci.*, **53**: 527-529.
- WATSON, D.L. (1976):** The effect of cytophilic IgG₂ on phagocytosis by bovine polymorphonuclear leucocytes. *Immunology*, **31**: 159-165.

BIBLIOGRAFIA

- WATSON, D.L. (1980):** Immunological functions of the mammary gland and its secretions-Comparative review. *Aust. J. Biol. Sci.*, 33: 403-422.
- WATSON, D.L. (1984):** Evaluation of attenuated, live staphylococcal mastitis vaccine in lactating heifers. *J. Dairy Sci.*, 67: 2608-2613.
- WATSON, D.L. (1987a):** Synergism between antibody and neutrophils in the ruminant mammary gland. *First Int. Congress of Vet. Imm.*, 17: 389-400.
- WATSON, D.L. (1987b):** The serological response of sheep to and killed *Staphylococcus aureus*. *Vaccine*, 45: 16-20.
- WATSON, D.L. (1988):** Vaccination against experimental staphylococcal mastitis in ewes. *Res. Vet. Sci.*, 45: 16-20.
- WATSON, D.L. (1992):** Vaccination against experimental staphylococcal mastitis in dairy heifers. *Res. Vet. Sci.*, 53: 346-353.
- WATSON, D.L., BRANDON, M.R., LASCELLES, A.K. (1972):** Concentration of immunoglobulins in mammary secretions with particular reference to selective transport of IgG₁. *Aust. J. Exp. Biol. Med. Sci.*, 50: 535-539.
- WATSON, D.L., HUSBAND, A.J. (1977):** The immunological functions of the intestine. *Vet. Rev. and Monogr., James Cook Univers., Australia*.
- WATSON, D.L., LASCELLES, A.K. (1973):** Comparison of immunoglobulin secretion in the salivary and mammary gland of sheep. *Aust. J. Exp. Biol. Med. Sci.*, 15: 255.
- WATSON, D.L., LASCELLES, A.K. (1975):** The influence of systemic immunization during mammary involution on subsequent antibody production in the mammary gland. *Res. Vet. Sci.*, 18: 182.
- WATSON, D.L., SCHWARTZKOFF, C.L. (1990):** A field try to test the efficacy of a staphylococcal mastitis vaccine in commercial dairies in Australia. *Proceed. Int. Symp. on Bovine Mastitis*, Indianapolis, Indiana, USA (Nat. Mastitis Counc.): 73-76.
- WEISSMANN, G. (1983):** Leukocytes as secretory organs of inflammation. The biology of immunologic disease. *Ed. Sinauser Assoc.*, Ch. 14: 155-166.
- WEISZ-CARRINGTON, P., ROUX, M.E., McWILLIAMS, M. (1978):** Hormonal induction of the secretory immune system in the mammary gland. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 75: 2928-2932.
- WERGIN, W.P., PAAPE, M.J. (1977):** Structure of polymorphonuclear leukocytes (PMN) isolated from bovine blood and milk. *J. Cell Biol.*, 75: 102.

BIBLIOGRAFIA

- WERGIN, W.P., PAAPE, M.J. (1978):** The mammary gland of the bovine as a source of polymorphonuclear neutrophils (PMN). *Fed. Proc.*, **37**: 937.
- WHITESIDE, W.H. (1939):** Observations on a new test for the presence of mastitis in milk. *Canad. Pub. Health J.*, **30**: 44.
- WILLIAMS, M.R., MAXWELL, D.A.G., SPOONER, R.L. (1975):** Quantitative studies on bovine immunoglobulins, normal plasma levels of IgG₂, IgG₁, IgM and IgA. *Res. Vet. Sci.*, **18**: 314-321.
- WILLIAMS, M.R., MILLAR, P. (1979):** Changes in serum immunoglobulin levels in Jerseys and Friesians near calving. *Res. Vet. Sci.*, **26**: 81-84.
- WILLIAMS, S.T., SHARPE, M.E., HOLT, J.G. (1984):** Bergey's manual of Systematic Bacteriology. Vol. 4. *Edit. Williams & Wilkins*. London.
- WILSON, C.D. (1980):** Antibiotic therapy in mastitis control. Mastitis Control and Herd Management. *Tec. Bull. 4, Nat. Inst. Res. in Dairying*, England: 113-127.
- WILSON, C.D., RICHARDS, M.S. (1980):** A survey of mastitis in the British dairy herd. *Vet. Rec.*, **106**: 431-435.
- WILSON, M.R. (1972):** The influence of preparturient intramammary vaccination on bovine mammary secretions. Antibody activity and protective value against *Escherichia coli* enteric infections. *Immunol.*, **23**: 947.
- WILSON, M.R., DUNCAN, J.R., HEISTAND, F., BROWN, P. (1972):** The influence of preparturient intramammary vaccination on immunoglobulin levels in bovine mammary secretions. *Immunol.*, **23**: 313-320.
- WINTER, A.J. (1979):** Mechanisms of immunity in bacterial infections. En Brandly CA, Cornelius CE (ed.): "Advances in Veterinary Science and Comparative Medicine". New York, *Academic Press*, **23**: 53-69.
- WISNIOWSKI, J., ROMANIUKOWA, K., GRAJEWSKI, H. (1965):** Phagocytosis phenomenon of cows. I. The opsonizing factor and the phagocytic activity of leukocytes in milk and blood. *Bull. Vet. Inst. Pulawy*. **9**: 140.
- WOODING, F.B.P., PEAKER, M., LINZELL, J.L. (1970):** Theories of milk secretion: Evidence from the electron microscopic examination of milk. *Nature, Lond.* **226**: 762-764.
- YOUMANS, G.P., PATERSON, P.Y., SOMMERS, H.M. (1975):** Biologic and clinical basis of infectious diseases. *W.B. Saunders Company*, London.



BIBLIOGRAFIA

ZEIDER, H., TOLLE, A., HEESCHEN, W. (1968a): Verbesserte Präparationstechnik zur elektronischen Bestimmung des Zellgehaltes in Milch. *Milchwissenschaft*, **23**: 564-568.

ZEIDER, H., TOLLE, A., HEESCHEN, W. (1968b): Suitability of direct and indirect cell counting methods for evaluating udder health and milk quality. *Arch. Lebensmittelhyg.*, **19**: 189-192.

ZIV, G. (1980a): Practical pharmacokinetic aspects of mastitis therapy-1: Parenteral treatment. *Agri Prac.*: 227-290.

ZIV, G. (1980b): Practical pharmacokinetic aspects of mastitis therapy-2: Practical & therapeutic applications. *Agri Prac.*: 469-474.

ZIV, G. (1980c): Practical pharmacokinetic aspects of mastitis therapy-3: Intramammary treatment. *Agri Prac.*: 469-474.

ZIV, G. (1980d): Drug Selection and Use in Mastitis: Systemic vs Local Therapy. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, **176**, **10** (2): 1109-1115.

ZIV, G., GORDON, S. (1973): The composition of bovine udder secretion during the first half of the dry period. *Zbl. Vet. Med.*, **20**: 285-291.

ZIV, G., SULMAN, F.G. (1972): Binding of antibiotics to bovine and ovine serum. *Antim. agents and Chemoth.*, **2**: 206-213.

ZWAHLEN, R. (1983): Lentivirus infections in goats with carpititis and interstitial mastitis. *Archiv. fur Tierheilkunde*, **125** (5): 281-299.

X.- TABLAS Y GRAFICOS

TABLA I

Resultados bacteriológicos de las muestras de leche de cabras con mastitis subclínica empleadas durante la primera experiencia.

ETIOLOGIA	N°	%
Estafilococos coagulasa negativo	16	43'24
Estafilococos coagulasa positivo	5	13'51
Enterobacterias	12	32'43
Estafilococos coagul. negativo y Enterobacterias	4	10'82
TOTAL	37	100'00

* N: nº de cepas aisladas correspondiente a cada género.

TABLA II

Resultados obtenidos con las técnicas de Fossomatic ($\times 10^3/\text{ml}$) y Coulter-Counter ($\times 10^3/\text{ml}$) en el lote de cabras sanas.

MESES*	FOSSOMATIC			COULTER-COUNTER		
	\bar{X}	DS	N**	\bar{X}	DS	N**
1	429'58	± 554'92	68	1341'99	± 942'09	68
2	349'28	± 341'44	72	902'66	± 789'93	72
3	438'39	± 437'80	83	1065'74	± 642'45	83
4	471'23	± 489'58	85	860'32	± 573'65	85
5	441'36	± 460'06	72	1080'65	± 929'25	72
6	590'26	± 547'11	71	1101'46	± 847'25	71
7	671'46	± 585'44	57	1296'82	± 1485'46	57

* MESES: Fecha en la que fueron recogidas las muestras de leche desde el primer mes de lactación.

** N: Número de muestras analizadas.

TABLA III

Resultados obtenidos con las técnicas de Fossomatic ($\times 10^3/\text{ml}$) y Coulter-Counter ($\times 10^3/\text{ml}$) en el lote de cabras sanas con 3 años de edad.

MESES*	FOSSOMATIC			COULTER-COUNTER		
	\bar{X}	DS	N**	\bar{X}	DS	N**
1	133'92	± 190'02	14	1093'11	± 661'11	14
2	100'18	± 123'65	16	628'55	± 634'34	16
3	107'22	± 118'38	18	712'36	± 339'03	18
4	127'94	± 174'23	18	518'25	± 376'05	18
5	235'66	± 267'14	18	618'94	± 393'19	18
6	221'76	± 263'97	18	657'55	± 447'29	18
7	470'50	± 406'58	14	716'53	± 825'88	14

* MESES: Fecha en la que fueron recogidas las muestras de leche desde el primer mes de lactación.

** N: Número de muestras analizadas.

TABLA IV

Resultados obtenidos con las técnicas de Fossomatic ($\times 10^3/\text{ml}$) y Coulter-Counter ($\times 10^3/\text{ml}$) en el lote de cabras sanas con 4 años de edad.

MESES*	FOSSOMATIC			COULTER-COUNTER		
	\bar{X}	DS	N**	\bar{X}	DS	N**
1	327'35	± 348'52	14	1466'03	± 1231'33	14
2	497'87	± 409'70	16	885'46	± 462'11	16
3	575'94	± 509'15	18	1024'01	± 576'38	18
4	573'00	± 285'78	18	809'33	± 481'65	18
5	529'81	± 535'80	16	836'32	± 683'99	16
6	722'83	± 585'79	18	873'20	± 384'46	18
7	924'83	± 527'56	12	1836'80	± 549'39	12

* MESES: Fecha en la que fueron recogidas las muestras de leche desde el primer mes de lactación.

** N: Número de muestras analizadas.

TABLA V

Resultados obtenidos con las técnicas de Fossomatic ($\times 10^3/\text{ml}$) y Coulter-Counter ($\times 10^3/\text{ml}$) en el lote de cabras sanas con 6 y 7 años de edad.

MESES*	FOSSOMATIC			COULTER-COUNTER		
	\bar{X}	DS	N**	\bar{X}	DS	N**
1	558'52	± 755'46	28	1293'00	± 897'02	28
2	386'54	± 326'31	28	807'96	± 582'16	28
3	538'35	± 465'56	33	1252'14	± 675'76	33
4	513'09	± 463'60	33	1047'06	± 600'14	33
5	499'86	± 511'40	28	899'82	± 409'87	28
6	615'96	± 390'06	23	1286'57	± 677'69	23
7	717'00	± 634'91	21	1427'38	± 1061'82	21

* MESES: Fecha en la que fueron recogidas las muestras de leche desde el primer mes de lactación.

** N: Número de muestras analizadas.

TABLA VI

Resultados obtenidos con las técnicas de Fossomatic (x 10³/ml) y Coulter-Counter (x 10³/ml) en el lote de cabras sanas con 8 y 9 años de edad.

MESES*	FOSSOMATIC			COULTER-COUNTER		
	\bar{X}	DS	N**	\bar{X}	DS	N**
1	524'33	± 446'84	12	2465'50	± 1723'68	12
2	490'58	± 464'28	12	1044'00	± 878'48	12
3	424'57	± 291'06	14	1170'23	± 762'84	14
4	546'37	± 501'01	16	763'00	± 331'88	16
5	533'77	± 339'51	10	2114'18	± 1159'82	10
6	798'63	± 383'30	12	1713'00	± 488'09	12
7	824'00	± 659'42	10	2762'00	± 2879'31	10

* MESES: Fecha en la que fueron recogidas las muestras de leche desde el primer mes de lactación.

** N: Número de muestras analizadas.

TABLA VII

Resultados obtenidos con la Prueba de California Mastitis Test en el lote de cabras sanas.

MESES*	MTC**					N***
	0	±	+	++	+++	
1	58'82	20'59	16'18	4'41	-	68
2	68'06	19'44	11'11	1'39	-	72
3	84'34	8'43	6'02	1'20	-	83
4	88'24	8'24	2'35	1'18	-	85
5	86'11	6'94	6'94	-	-	72
6	76'06	14'08	9'86	-	-	71
7	73'68	8'77	12'28	5'26	-	57

* MESES: Fecha en la que fueron recogidas las muestras de leche desde el primer mes de lactación.

** MTC: Resultados obtenidos con la Prueba de California Mastitis Test en las muestras de leche expresadas en % de las mismas para cada nivel de la lectura de la reacción.

*** N: Número de muestras analizadas.

TABLA VIII

Resultados obtenidos con la Prueba de California Mastitis Test en el lote de cabras sanas con 3 años de edad.

MESES*	MTC**					N***
	0	±	+	++	+++	
1	71'43	14'29	14'29	-	-	14
2	81'25	18'75	-	-	-	16
3	100'00	-	-	-	-	18
4	100'00	-	-	-	-	18
5	100'00	-	-	-	-	18
6	77'78	16'67	5'56	-	-	18
7	85'71	7'14	7'14	-	-	14

* MESES: Fecha en la que fueron recogidas las muestras de leche desde el primer mes de lactación.

** MTC: Resultados obtenidos con la Prueba de California Mastitis Test en las muestras de leche expresadas en % de las mismas para cada nivel de la lectura de la reacción.

*** N: Número de muestras analizadas.

TABLA IX

Resultados obtenidos con la Prueba de California Mastitis Test en el lote de cabras sanas con 4 años de edad.

MESES*	MTC**					N***
	0	±	+	++	+++	
1	71'43	7'14	21'43	-	-	14
2	75'00	12'50	6'25	6'25	-	16
3	72'22	16'67	11'11	-	-	18
4	77'77	16'67	5'56	-	-	18
5	81'25	12'50	6'25	-	-	16
6	94'44	5'56	-	-	-	18
7	66'67	16'67	16'67	-	-	12

* MESES: Fecha en la que fueron recogidas las muestras de leche desde el primer mes de lactación.

** MTC: Resultados obtenidos con la Prueba de California Mastitis Test en las muestras de leche expresadas en % de las mismas para cada nivel de la lectura de la reacción.

*** N: Número de muestras analizadas.

TABLA X

Resultados obtenidos con la Prueba de California Mastitis Test en el lote de cabras sanas con 6-7 años de edad.

MESES*	MTC**					N***
	0	±	+	++	+++	
1	44'83	27'59	17'24	10'34	-	29
2	64'29	21'43	14'29	-	-	28
3	78'79	9'09	9'09	3'30	-	33
4	87'88	9'09	3'30	-	-	33
5	75'00	10'71	14'29	-	-	28
6	60'87	21'74	17'39	-	-	23
7	71'43	4'76	19'05	4'76	-	21

* MESES: Fecha en la que fueron recogidas las muestras de leche desde el primer mes de lactación.

** MTC: Resultados obtenidos con la Prueba de California Mastitis Test en las muestras de leche expresadas en % de las mismas para cada nivel de la lectura de la reacción.

*** N: Número de muestras analizadas.

TABLA XI

Resultados obtenidos con la Prueba de California Mastitis Test en el lote de cabras sanas con 8-9 años de edad.

MESES*	MTC**					N***
	0	±	+	++	+++	
1	66'67	25'00	8'33	-	-	12
2	50'00	25'00	25'00	-	-	12
3	92'86	7'14	-	-	-	14
4	87'50	6'25	-	6'25	-	16
5	100'00	-	-	-	-	10
6	75'87	8'33	16'67	-	-	12
7	70'00	20'00	-	10'00	-	10

* MESES: Fecha en la que fueron recogidas las muestras de leche desde el primer mes de lactación.

** MTC: Resultados obtenidos con la Prueba de California Mastitis Test en las muestras de leche expresadas en % de las mismas para cada nivel de la lectura de la reacción.

*** N: Número de muestras analizadas.

TABLA XII

Resultados obtenidos con las técnicas de Fossomatic (x 10³/ml) y Coulter-Counter (x 10³/ml) en el lote de cabras con mastitis subclínica.

MESES*	FOSSOMATIC			COULTER-COUNTER		
	\bar{X}	DS	N**	\bar{X}	DS	N**
1	2039'52	± 2267'29	23	6891'70	± 8350'70	23
2	1908'69	± 1717'32	25	6003'94	± 7927'44	25
3	2168'41	± 1884'14	37	3828'28	± 2536'08	37
4	2489'63	± 1425'04	41	5472'62	± 4914'74	41
5	2174'97	± 1610'01	36	4310'14	± 3069'88	36
6	3393'83	± 2148'33	36	6515'49	± 5898'88	36
7	2671'44	± 1887'26	18	7244'78	± 8563'90	18

* MESES: Fecha en la que fueron recogidas las muestras de leche desde el primer mes de lactación.

** N: Número de muestras analizadas.

TABLA XIII

Resultados obtenidos con la Prueba de California Mastitis Test en cabras con mastitis subclínica.

MESES*	MTC**					N***
	0	±	+	++	+++	
1	13'04	26'09	30'43	17'39	13'04	23
2	20'00	28'00	16'00	24'00	12'00	25
3	24'32	18'92	21'62	21'62	13'51	37
4	26'83	17'07	21'95	19'51	14'63	41
5	27'78	25'00	19'44	19'44	8'33	36
6	19'44	16'67	11'11	38'89	13'89	36
7	22'22	11'11	22'22	22'22	22'22	18

* MESES: Fecha en la que fueron recogidas las muestras de leche desde el primer mes de lactación.

** MTC: Resultados obtenidos con la Prueba de California Mastitis Test en las muestras de leche expresadas en % de las mismas para cada nivel de la lectura de la reacción.

*** N: Número de muestras analizadas.

TABLA XIV

Resultados obtenidos con las técnicas de Fossomatic (x 10³/ml) y Coulter-Counter (x 10³/ml) en el lote de cabras con mastitis subclínica debidas a estafilococos coagulasa negativo.

MESES*	FOSSOMATIC			COULTER-COUNTER		
	\bar{X}	DS	N**	\bar{X}	DS	N**
1	2968'00	± 2624'03	5	13128'20	± 13387'57	5
2	1375'29	± 1087'16	7	8246'43	± 11145'78	7
3	2342'80	± 1862'86	10	3318'25	± 2766'69	10
4	1746'38	± 920'95	13	2303'27	± 1311'72	13
5	1813'14	± 837'19	14	2536'34	± 884'24	14
6	2904'13	± 1959'48	16	4784'19	± 4704'04	16
7	2043'70	± 1234'76	10	6106'70	± 7550'99	10

* MESES: Fecha en la que fueron recogidas las muestras de leche desde el primer mes de lactación.

** N: Número de muestras analizadas.

TABLA XV

Sensibilidad y especificidad de la prueba de California Mastitis Test.

MTC	Cultivo bacteriológico*		
	ENFERMOS	SANOS	Total
ENFERMOS	89	100	189
SANOS	32	609	641
Total	121	709	

*** Según Manser (1981)**

SENSIBILIDAD= 76 %

ESPECIFICIDAD= 86 %

TABLA XVI

Sensibilidad y especificidad de la prueba de contaje celular con la técnica Fossomatic.

Fossomatic	Cultivo bacteriológico*		
	ENFERMOS	SANOS	Total
ENFERMOS	105	87	192
SANOS	19	619	638
Total	124	709	

*** Según Manser (1981)**

SENSIBILIDAD= 85 %

ESPECIFICIDAD= 88 %

TABLA XVII

Sensibilidad y especificidad de la prueba de contaje celular con la técnica Coulter-Counter.

Coulter-Counter	Cultivo bacteriológico*		
	ENFERMOS	SANOS	Total
ENFERMOS	83	76	159
SANOS	41	630	671
Total	124	706	

*** Según Manser (1981)**

SENSIBILIDAD= 67 %

ESPECIFICIDAD= 89 %

TABLA XVIII**Concentración de IgG (mg/ml) en el lote de cabras sanas.**

Días*	\bar{X}	DS	N**
1	10.89 ±	2.19	12
2	8.87 ±	2.38	16
3	7.20 ±	2.20	16
4	6.90 ±	1.94	14
5	6.09 ±	1.79	16
6	5.44 ±	1.56	16
7	5.09 ±	1.44	16
10	4.34 ±	1.21	16
14	3.91 ±	1.01	16
20	3.51 ±	1.14	16
30	3.40 ±	1.05	16
45	3.25 ±	1.05	16
60	3.12 ±	0.96	16
90	2.94 ±	0.92	16
150	2.45 ±	0.40	16
180	2.43 ±	0.52	16

*Días: Fecha en la que fueron recogidas las muestras de leche desde el momento del parto de las cabras.

**N: Número de muestras analizadas.

TABLA XIX

Concentración de IgG en el lote de cabras con mastitis subclínica.

MESES*	CONCENTRACION DE IgG (mg/ml)		
	\bar{X}	DS	N**
1	3.26 ±	1.74	14
1'5	2.31 ±	1.26	18
2	2.73 ±	1.95	20
3	2.38 ±	1.77	19
5	1.62 ±	1.58	18
6	1.33 ±	1.13	16

* MESES: fecha en la que fueron recogidas las muestras de leche desde el primer mes de lactación.

** N: Número de muestras analizadas.

TABLA XX

Resultados bacteriológicos de las muestras de leche de cabras con mastitis subclínica empleadas durante la segunda experiencia.

ETIOLOGIA	N*	%
Estafilococos coagulasa negativos	16	50'00
Estafilococos coagulasa negativos y enterobacterias	3	9'38
Micoplasmas	2	6'25
Enterobacterias	1	3'13
<i>Bacillus spp.</i>	1	3'13
TOTAL	23	100'00

* N: nº de cepas aisladas correspondiente a cada género.

TABLA XXI

Resultados obtenidos con las técnicas de Fossomatic (x 10³/ml) y Coulter-Counter (x 10³/ml) en el lote de cabras con mastitis subclínica.

MESES*	FOSSOMATIC			COULTER		
	\bar{X}	DS	N**	\bar{X}	DS	N**
1	1963'27	± 1702'83	11	3465'50	± 2433'50	11
1'5	2007'63	± 934'75	17	3475'56	± 2030'24	17
2	1923'39	± 1311'12	20	4307'65	± 3691'12	20
3	2008'22	± 1517'45	18	5263'08	± 4399'41	18
5	2251'88	± 1288'39	18	3230'09	± 1930'18	18
6	2116'13	± 883'22	20	3265'58	± 2241'99	20

* Meses: Fecha en la que fueron recogidas las muestras de leche desde el primer mes de lactación.

** N: Número de muestras analizadas.

TABLA XXII

Resultados obtenidos con la Prueba de California Mastitis Test en cabras con mastitis subclínica.

MESES*	MTC**					N***
	0	±	+	++	+++	
1	9'09	27'27	45'45	18'18	-	11
1'5	-	37'50	50'00	6'25	6'25	
2	5'00	40'00	35'00	15'00	5'00	20
3	10'00	45'00	20'00	20'00	5'00	
5	-	22'22	38'88	27'77	11'11	18
6	-	20'00	50'00	25'00	5'00	20

* MESES: Fecha en la que fueron recogidas las muestras de leche desde el inicio de la lactación.

** MTC: Resultados obtenidos con la Prueba de California Mastitis Test en las muestras de leche expresadas en % de las mismas para cada nivel de la lectura de reacción.

*** N: Número de muestras analizadas.

TABLAS Y GRAFICOS

GRAFICOS

TABLAS Y GRAFICOS

GRAFICO 1: RESULTADOS BACTERIOLOGICOS DE LAS MUESTRAS DE LECHE CON MASTITIS SUBCLINICA

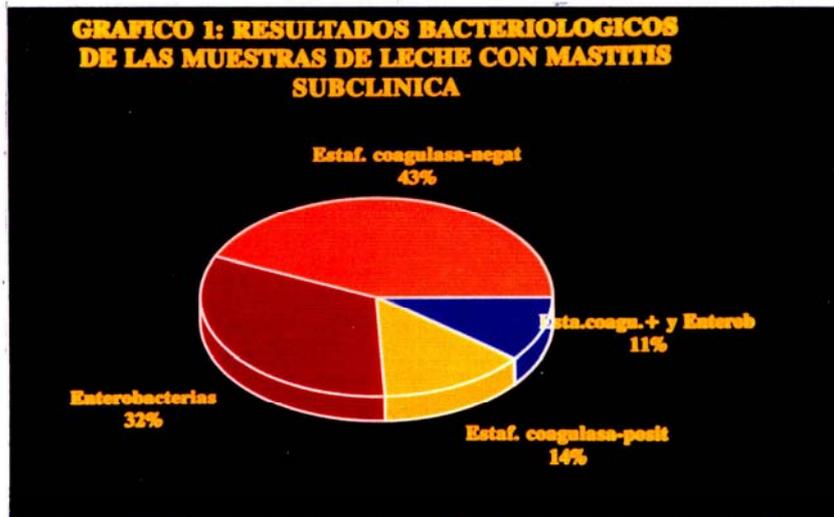
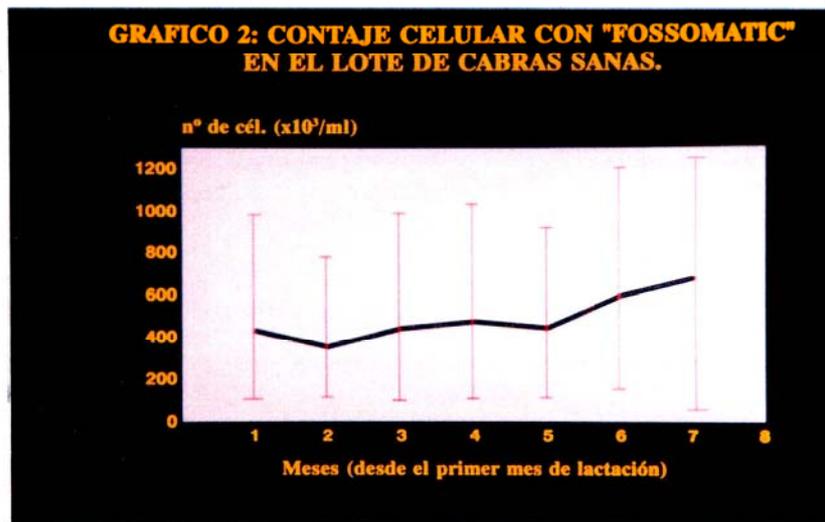


GRAFICO 2: CONTAJE CELULAR CON "FOSSOMATIC" EN EL LOTE DE CABRAS SANAS.



TABLAS Y GRAFICOS

GRAFICO 3: CONTAJE CELULAR CON FOSSOMATIC EN EL LOTE DE CABRAS SANAS CON 3 AÑOS DE EDAD.

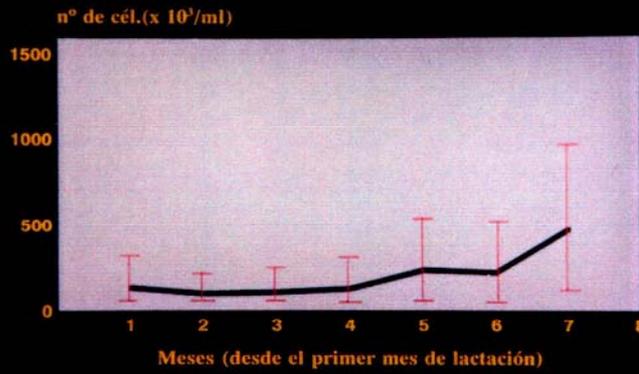
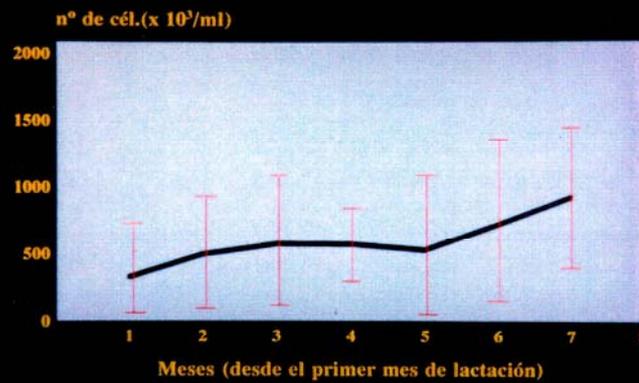


GRAFICO 4: CONTAJE CELULAR CON FOSSOMATIC EN EL LOTE DE CABRAS SANAS CON 4 AÑOS DE EDAD.



TABLAS Y GRAFICOS

GRAFICO 5: CONTAJE CELULAR CON FOSSOMATIC EN EL LOTE DE CABRAS SANAS CON 6-7 AÑOS DE EDAD.

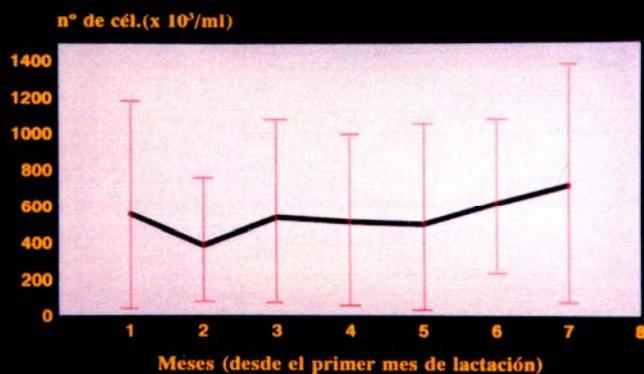
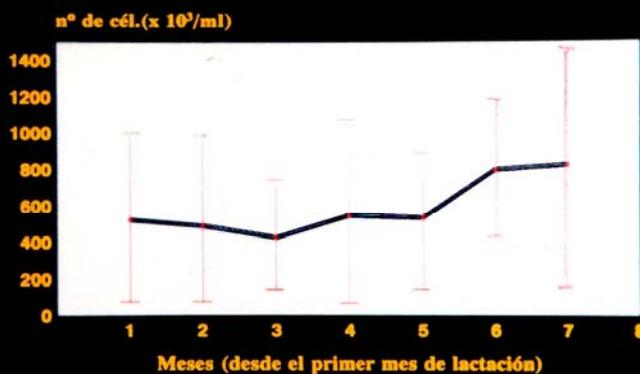


GRAFICO 6: CONTAJE CELULAR CON FOSSOMATIC EN EL LOTE DE CABRAS SANAS CON 8-9 AÑOS DE EDAD.



TABLAS Y GRAFICOS

GRAFICO 7: CONTAJE CELULAR CON "COULTER" EN EL LOTE DE CABRAS SANAS.

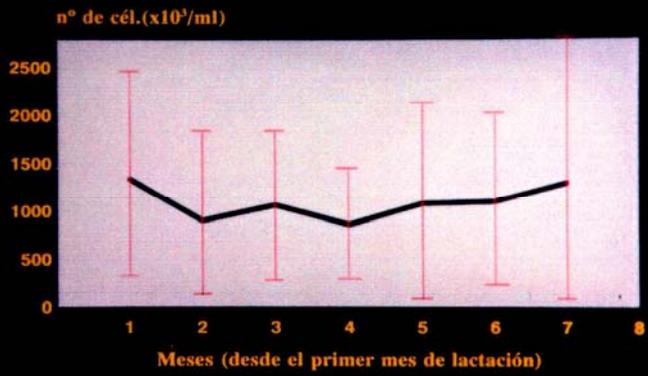
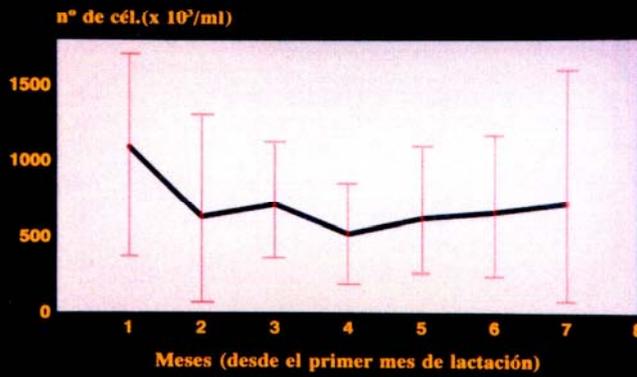


GRAFICO 8: CONTAJE CELULAR CON COULTER EN EL LOTE DE CABRAS SANAS CON 3 AÑOS DE EDAD.



TABLAS Y GRAFICOS

GRAFICO 9: CONTAJE CELULAR CON COULTER EN EL LOTE DE CABRAS SANAS CON 4 AÑOS DE EDAD.

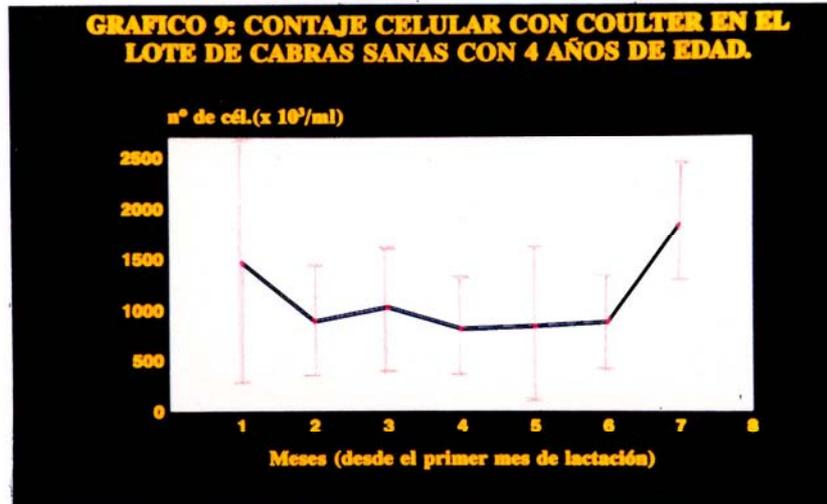


GRAFICO 10: CONTAJE CELULAR CON COULTER EN EL LOTE DE CABRAS SANAS CON 6-7 AÑOS DE EDAD.

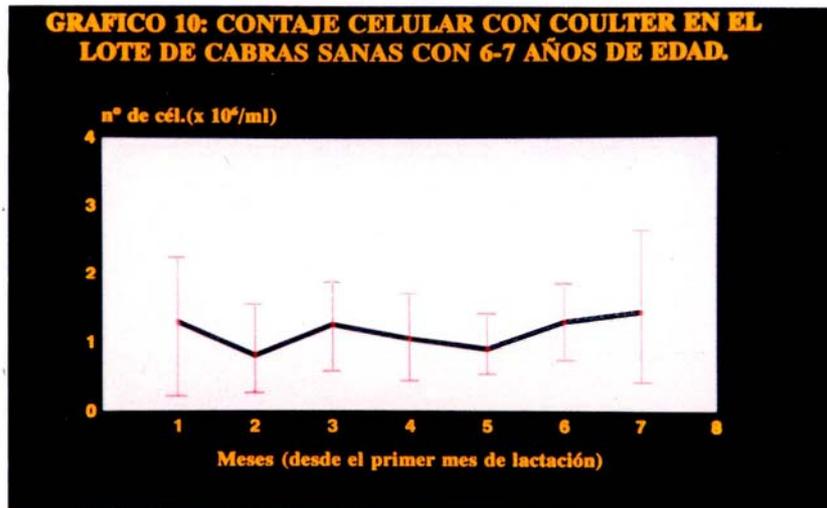


GRAFICO 11: CONTAJE CELULAR CON COULTER EN EL LOTE DE CABRAS SANAS CON 8-9 AÑOS DE EDAD.

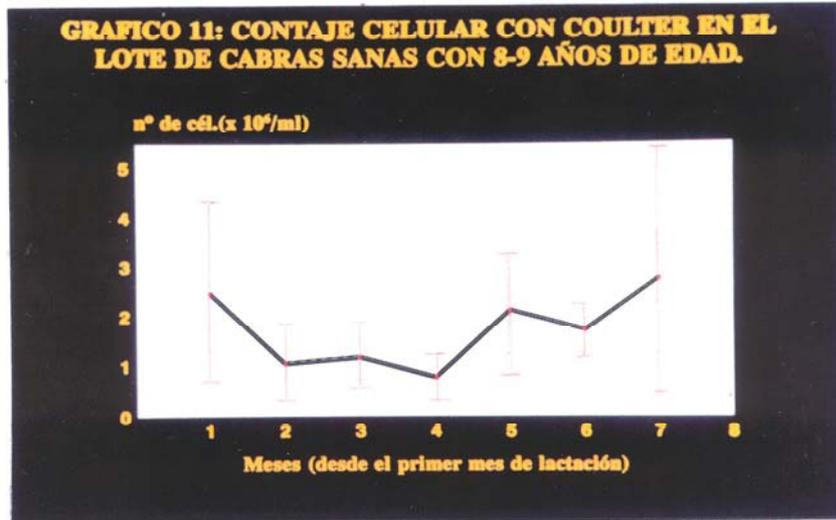


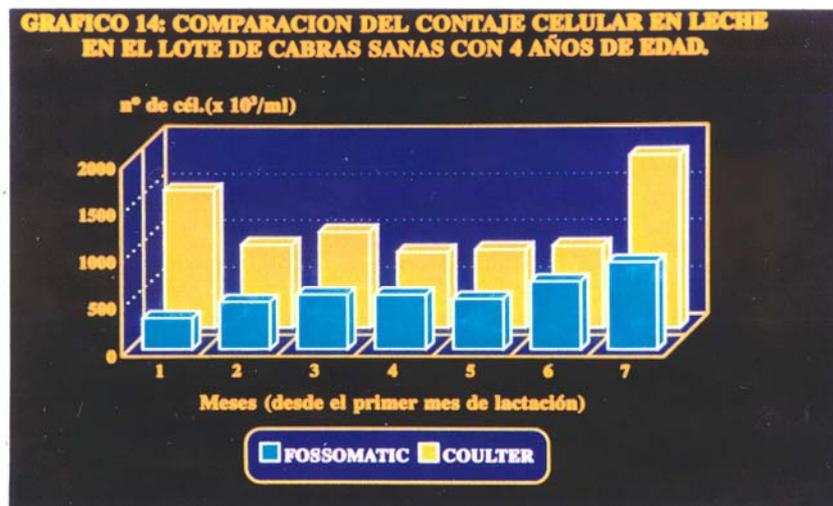
GRAFICO 12: COMPARACION DEL CONTAJE CELULAR EN LECHE DE CABRAS SANAS.



GRAFICO 13: COMPARACION DEL CONTAJE CELULAR EN LECHE EN EL LOTE DE CABRAS SANAS CON 3 AÑOS DE EDAD.



GRAFICO 14: COMPARACION DEL CONTAJE CELULAR EN LECHE EN EL LOTE DE CABRAS SANAS CON 4 AÑOS DE EDAD.



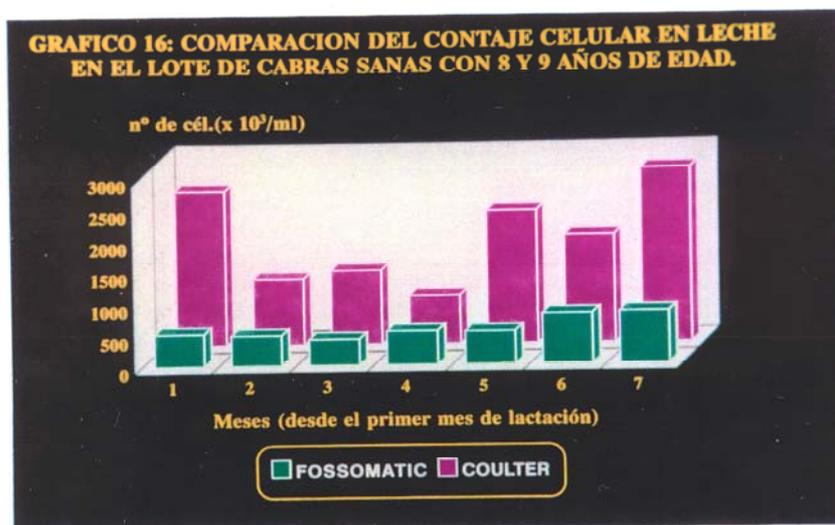
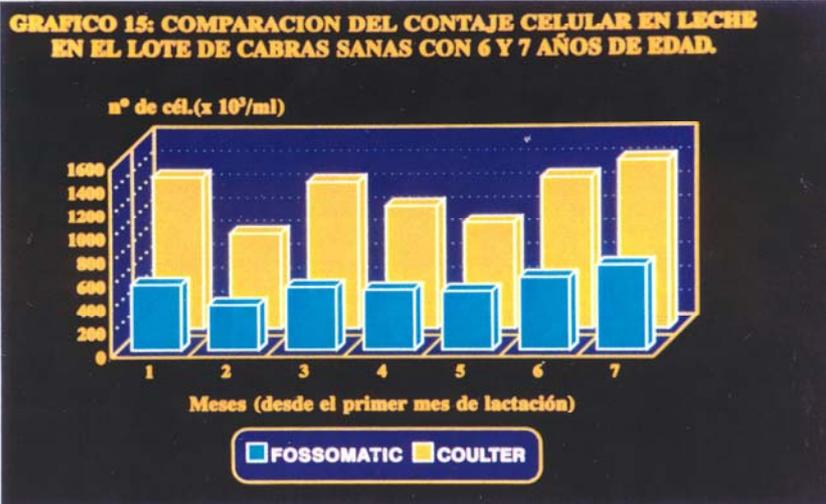


GRAFICO 17: RESULTADOS AL CALIFORNIA MASTITIS TEST EN EL LOTE DE CABRAS SANAS.

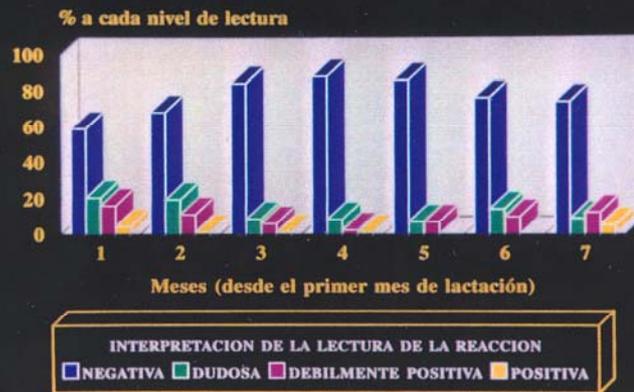
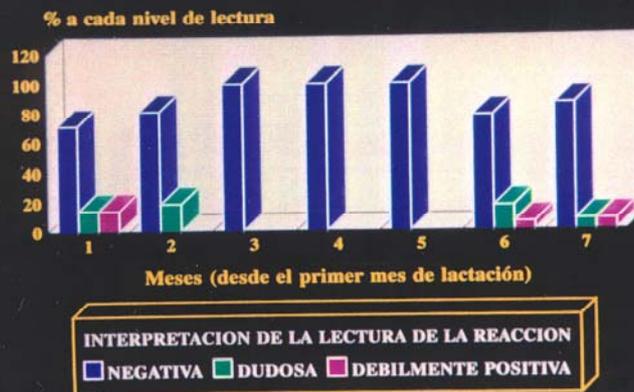


GRAFICO 18: RESULTADOS AL CALIFORNIA MASTITIS TEST EN EL LOTE DE CABRAS SANAS CON 3 AÑOS DE EDAD.



TABLAS Y GRAFICOS

GRAFICO 19: RESULTADOS AL CALIFORNIA MASTITIS TEST EN EL LOTE DE CABRAS SANAS CON 4 AÑOS DE EDAD.

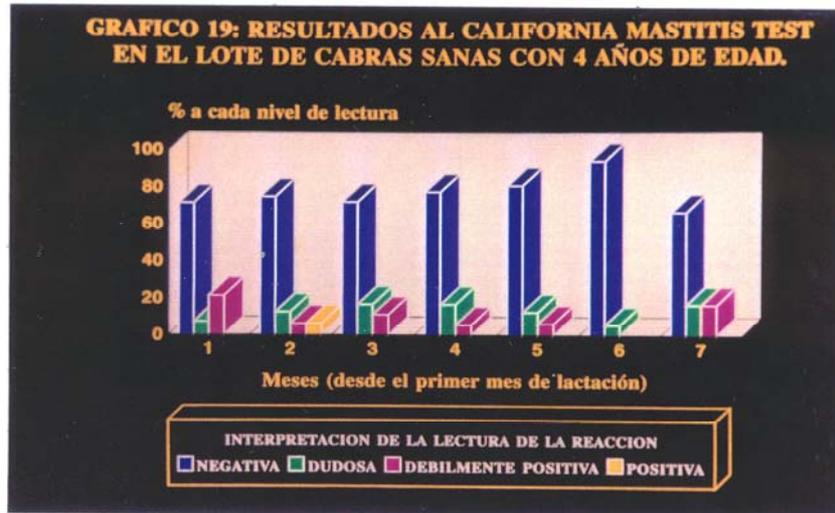
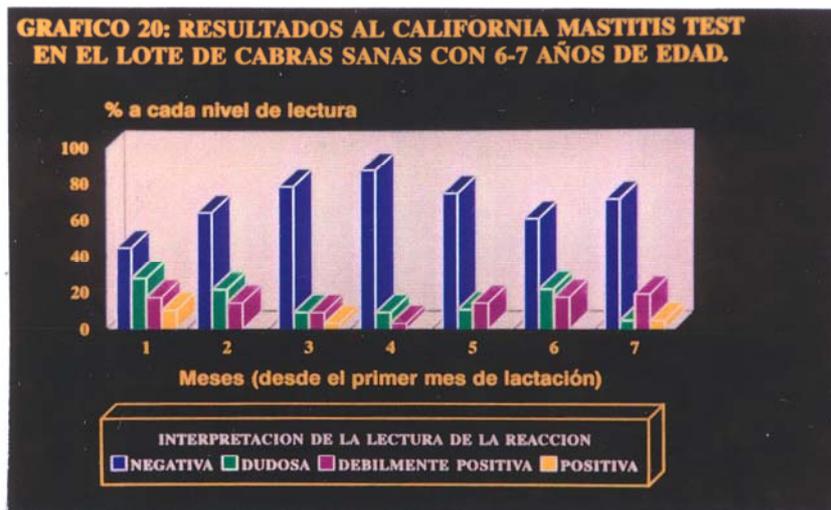
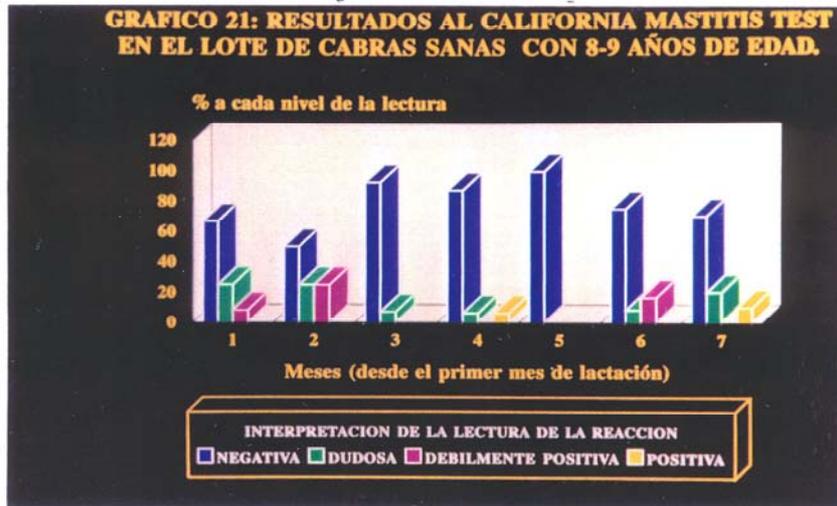
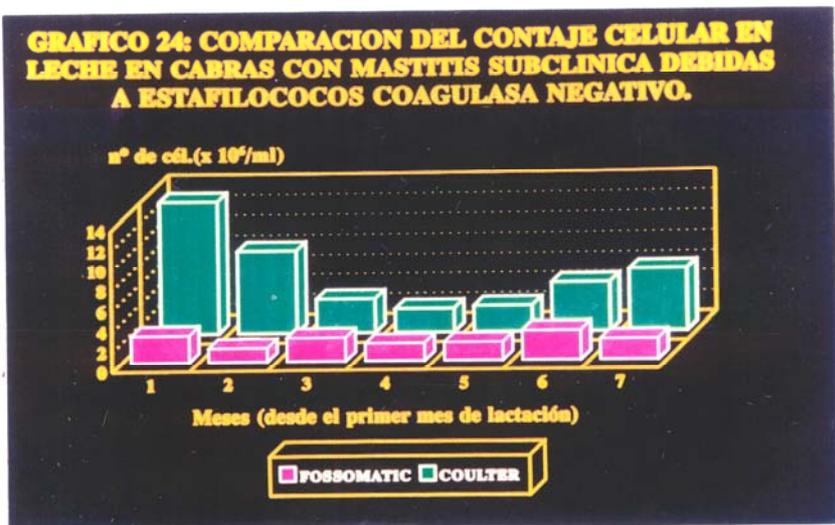


GRAFICO 20: RESULTADOS AL CALIFORNIA MASTITIS TEST EN EL LOTE DE CABRAS SANAS CON 6-7 AÑOS DE EDAD.



TABLAS Y GRAFICOS





TABLAS Y GRAFICOS

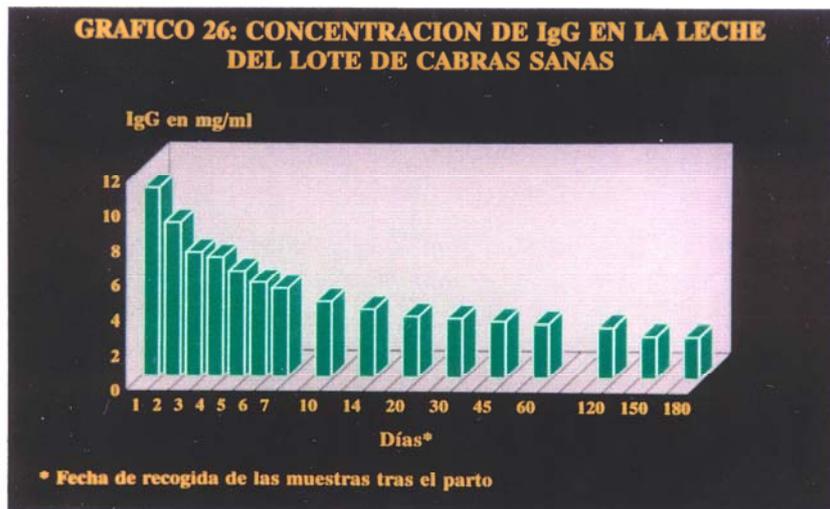
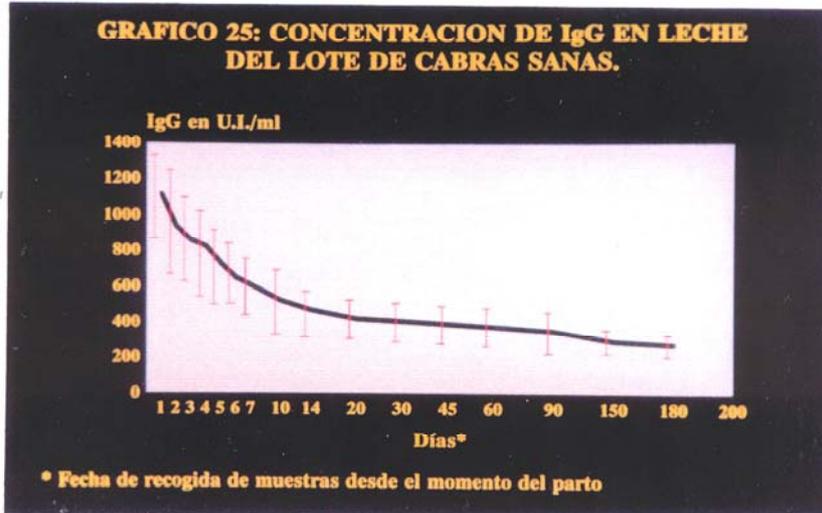


GRAFICO 27: CONCENTRACION DE IgG EN LA LECHE DEL LOTE DE CABRAS CON MASTITIS SUBCLINICA.

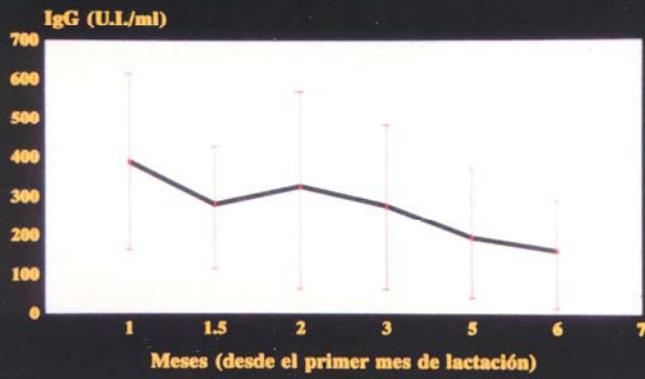
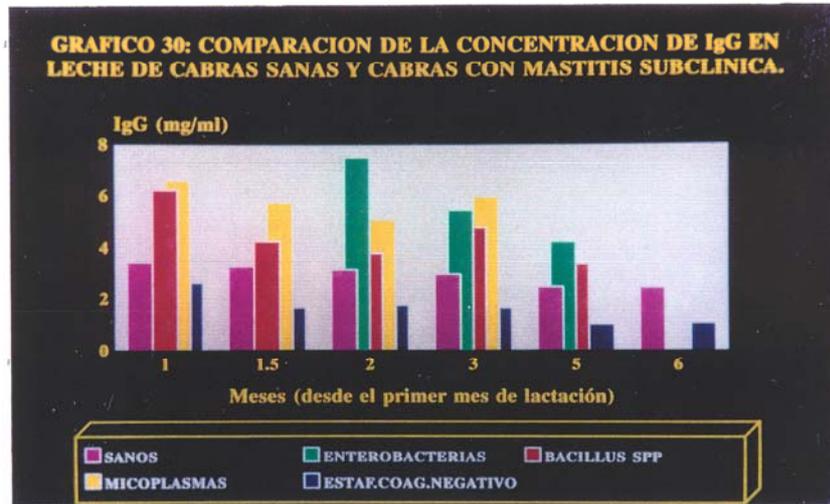
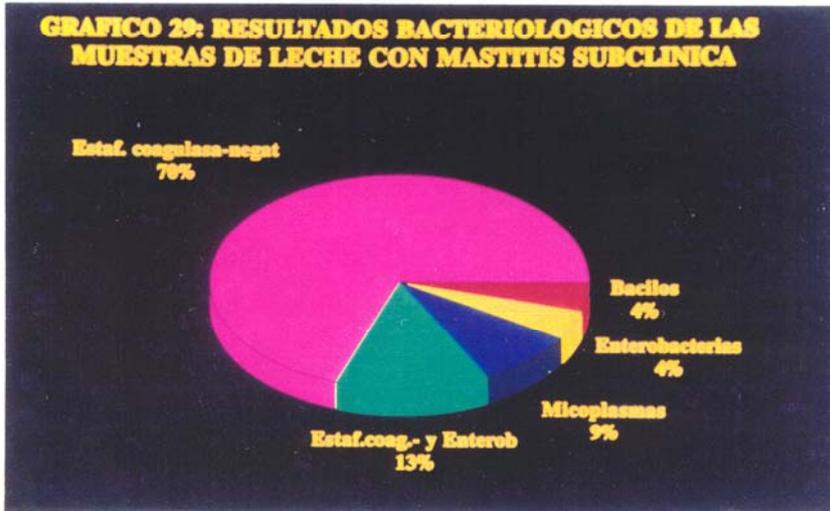


GRAFICO 28: CONCENTRACION DE IgG EN LECHE DE CABRAS SANAS Y CABRAS CON MASTITIS SUBCLINICA.



TABLAS Y GRAFICOS

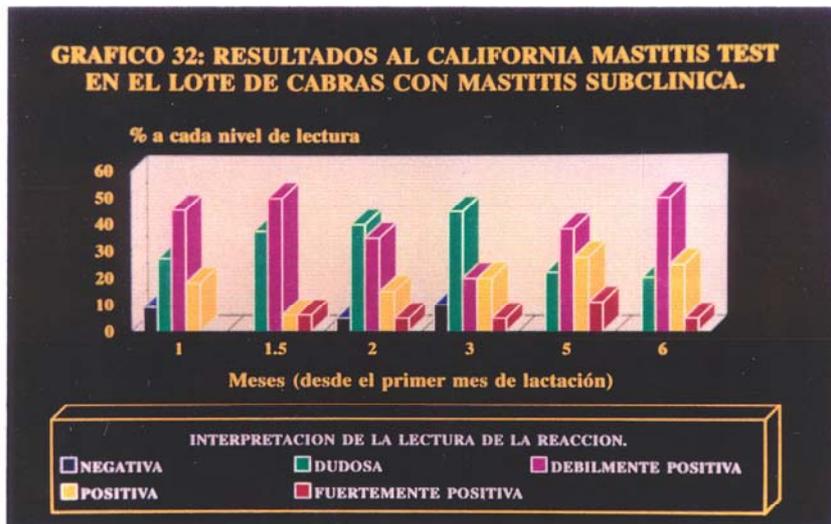


TABLAS Y GRAFICOS

GRAFICO 31: COMPARACION DEL CONTAJE CELULAR EN LECHE EN EL LOTE DE CABRAS CON MASTITIS SUBCLINICA



GRAFICO 32: RESULTADOS AL CALIFORNIA MASTITIS TEST EN EL LOTE DE CABRAS CON MASTITIS SUBCLINICA.



XI.- AGRADECIMIENTOS

AGRADECIMIENTOS

A D. Fernando Real Valcárcel, por su sincera amistad, dedicación y constante orientación durante la realización de este trabajo.

A la Dra. Ana Bassols del Departamento de Bioquímica de la Facultad de Veterinaria de la Universidad Autónoma de Barcelona por su apoyo y ayuda en la elaboración de esta investigación.

A mis amigos Mabel Molina Toledo Y Valeriano Moreno-Torres por su excelente hospitalidad y amabilidad durante mis periodos de estancia en la ciudad de Barcelona para llevar a cabo este trabajo.

A Dña. Emilia Ramos por su incondicional ayuda en los inicios de esta investigación.

A los ganaderos D. Luis Naranjo y Juan Jesús Ojeda por su inestimable colaboración en el desarrollo de la fase experimental de este trabajo.

A mis compañeros D. Carlos Gutiérrez, Dña. M^a Carmen Muñoz, D. Manolo Morales y D. Enrique Grau-Bassas por su apoyo, amistad y comprensión.

A D. Juan Manuel Afonso y D. Pedro Saavedra por su ayuda en el tratamiento estadístico de los datos.

A Dña. Pilar Santana González por su ayuda técnica.

Al equipo de Enfermedades Infecciosas de la Facultad de Veterinaria de Las Palmas de G.C. por su colaboración, amistad y valiosísima ayuda.

A la Fundación Universitaria de Las Palmas de Gran Canaria por la financiación concedida para llevar a cabo parte de la realización de esta investigación.

Al profesorado de la Facultad de Veterinaria de la Universidad de Las Palmas de Gran Canaria, cuya ilusión ha servido de estímulo para la