

DIAGNÓSTICO DE MASTITIS SUBCLÍNICA DE VACUNOS LECHEROS MEDIANTE EL CONTEO DE CÉLULAS SOMÁTICAS EMPLEANDO DOS MÉTODOS DIAGNÓSTICOS

Diagnosis of subclinc mastitis in dairy cattle through somatic cell counts using two diagnostic methods

Luis Felipe Ruiz-García¹ y Rocío Silvia Sandoval-Monzón²

¹ Grupo de Investigación GIRESA, Facultad de Medicina Veterinaria. Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima, Perú;

² Clínica de Animales Mayores, Facultad de Medicina Veterinaria. Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima, Perú. Correspondencia: rocio.sandoval@unmsm.edu.pe.

RESUMEN

El objetivo fue comparar los resultados del conteo de células somáticas (CCS) empleando la citometría de flujo por imágenes (CFI) y la tradicional prueba de mastitis de California (CMT) en el diagnóstico de mastitis subclínica en los bovinos lecheros. Se analizó un total de 44 muestras de leche. Se consideraron para el estudio sólo las muestras de cuartos mamarios que no presentaba mastitis clínica. Mediante CMT se clasificaron las muestras en negativas, con reacción débil, con reacción distinguible y con reacción fuertemente positiva. La concentración de CS en la leche fue evaluada empleando la tinción de Sybr Green I. Se calculó el coeficiente de correlación de Spearman entre el CCS y el puntaje de CMT, se calculó el coeficiente de asociación de Tau-b de Kendall entre la respuesta al CMT y a tres niveles del CCS (menos de 750×10^3 ; 750×10^3 a 1500×10^3 ; más de 1500×10^3 células por mL) y se calculó el nivel de concordancia entre ambas pruebas utilizando un umbral de 1000×10^3 células por mL para el diagnóstico de la mastitis subclínica, mediante el índice de Kappa de Cohen. Al realizarse un análisis de correlación de Spearman, el coeficiente de correlación fue de 0,26 ($P > 0,05$), el cual es un nivel de correlación bajo. El análisis estadístico revela que los resultados no estuvieron asociados, ya que el coeficiente de asociación de Tau-b de Kendall fue de 0,15 ($P > 0,05$). El CMT fue eficiente en la discriminación CCS a un nivel de 1000×10^3 células por mL con una sensibilidad de 69,2% y una especificidad del 71,0%. Mostrando un coeficiente de concordancia de Kappa de Cohen de 0,36 ($P < 0,05$). Los resultados del presente trabajo sugieren que la CFI puede ser una buena alternativa y una herramienta complementaria para evaluar la salud de la ubre.

Palabras clave: Mastitis subclínica; citometría de flujo; conteo de células somáticas; vacas lecheras; CMT.

ABSTRACT

The objective was to compare somatic cell counts (CCS) using flow cytometry by imaging (CFI) and the traditional California Mastitis Test (CMT) in the diagnosis of subclinical mastitis in dairy cattle. A total of 44 milk samples were analyzed. Only the samples of mammary quarters that did not present clinical mastitis were considered for the study. The results obtained by CMT were classified as negative, with weak reaction, with distinguishable reaction and with strongly positive reaction. The CCS performed by flow cytometry was performed using the Sybr Green I stain. The Spearman correlation coefficient between the CCS and the CMT score was calculated, the Kendall's Tau-b coefficient was calculated between the response to CMT and three levels of CCS (less than 750×10^3 ; 750×10^3 to 1500×10^3 ; more than 1500×10^3 cells per mL). Likewise, the level of agreement between the two tests was calculated using a threshold of 1000×10^3 cells per mL for the diagnosis of subclinical mastitis using the Cohen's Kappa index. The correlation coefficient when performing the Spearman analysis was 0.26 ($P > 0.05$), which is a low correlation level. Statistical analysis revealed that the results were not associated, since the association coefficient of Kendall's Tau-b was 0.15 ($P > 0.05$). The best efficiency of CMT was obtained in the CCS discrimination at a level of 1000×10^3 cells per mL with a sensitivity of 69.2% and a specificity of 71.0%; presenting a Cohen's Kappa index of 0.36 ($P < 0.05$). The results of this work suggest that CFI can be a good alternative and a complementary tool to assess the health of the udder.

Key words: Subclinical mastitis; flow cytometry; somatic cell counts; dairy cattle; CMT.

INTRODUCCIÓN

La mastitis en su forma clínica y subclínica es la enfermedad más costosa en la ganadería lechera. Produce importantes pérdidas económicas porque es causa de reducción de la producción y calidad láctea, incremento de gastos en tratamiento, retención de leche por tratamiento y sacrificio prematuro [15, 19, 29]. Los establos invierten mucho tiempo y dinero realizando buenas prácticas de manejo [15] y tratamientos con la finalidad de controlar la enfermedad [15]. Sin embargo, también deben realizar una evaluación y monitoreo constante, para lo cual se deben emplear técnicas confiables que evalúen la efectividad de las prácticas de manejo y tratamientos realizados en el establo. Una forma de realizar este monitoreo es evaluando constantemente el comportamiento de la mastitis subclínica [15].

La mastitis subclínica no muestra signos evidentes y la leche es aparentemente normal. Sin embargo, durante todo el tiempo de infección, los microorganismos responsables van propagando la infección en el establo lechero [5]. Se ha demostrado que cuando se produce una infección intramamaria se produce una disminución de la capacidad de producción de la glándula y una alteración en los componentes de la leche [29]. La mastitis subclínica puede causar una reducción del 1,2 al 33% en la producción de leche de las vacas (*Bos taurus*) en lactación que son afectadas [17] y es responsable de aproximadamente 70% de las pérdidas económicas producidas por todos los tipos de mastitis [27].

La mastitis subclínica puede ser detectada mediante la medición de componentes inflamatorios y agentes patógenos en la leche [28]. El incremento del conteo de las células somáticas (CCS) es el primer indicador de inflamación en la ubre. El CCS que puede incluir hasta un 75% de leucocitos y un 25% de células epiteliales [25]. Los leucocitos aumentan en respuesta a infección bacteriana, la lesión de tejido y al estrés pues cumplen una función protectora. Sin embargo, un CCS elevado tiene una influencia negativa en la calidad de la leche cruda. La mastitis subclínica está siempre relacionada con la baja producción de leche, cambios en la consistencia de la leche (densidad), reducción de la posibilidad de procesamiento adecuado de la leche, baja proteína y alto riesgo de higiene de la leche, ya que puede incluso contener organismos patógenos [23]. Normalmente, en la leche de una glándula mamaria saludable, el CCS es inferior a 100×10^3 células/mL, mientras que la infección bacteriana puede hacer que aumente a más de 1000×10^3 células/mL [2]. El CCS es muy variable durante la campaña de lactancia y puede aumentar de manera fisiológica en los primeros días y mantenerse alta hasta el primer mes de lactancia [1]. Así también, el CCS aumenta hacia el final de la campaña de lactancia [8].

Existen en el mercado muchos métodos para monitorear la mastitis subclínica de un establo lechero, entre éstos se tienen a los cultivos bacteriológicos, la conductividad eléctrica, la prueba de la mastitis de California (CMT), el CCS, algunos métodos

bioquímicos [12, 28], y últimamente se han realizado muchos estudios sobre el conteo diferencial de células somáticas [17, 18, 20, 21]. Los cultivos bacteriológicos de leche son métodos estándares para la identificación de la mastitis clínica y subclínica, sin embargo, no se realizan a menudo, debido a los problemas de contaminación y distancia que existen entre los establos y los laboratorios [24]. Se ha demostrado que el CMT es un indicador para la mastitis subclínica a nivel del hato [7], sin embargo, no es un método muy preciso a nivel individual [11]. El objetivo del presente trabajo fue comparar los resultados del CCS empleando un método bastante preciso que es la citometría de flujo por imágenes y el tradicional CMT.

MATERIALES Y MÉTODOS

Lugar de estudio

Las muestras de leche bovina empleadas en el presente estudio fueron recolectadas de diferentes establos de la provincia de Lima, Perú. El procesamiento de las mismas se realizó en el laboratorio de la Clínica de Animales Mayores de la Facultad de Medicina Veterinaria de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos (UNMSM).

Muestra de estudio

Las muestras de leche provinieron de vacas adultas de raza Holstein, en diferentes etapas de lactación, que no presentaban ningún problema sanitario clínico. Se tomaron un total de 44 muestras de leche, las cuales fueron obtenidas directamente de la glándula mamaria mediante ordeño manual y considerando los procedimientos descritos por Sears y col. [22] para el diagnóstico y control de mastitis. Se consideraron para el estudio sólo las muestras de cuartos mamarios que no presentaba mastitis clínica. Inmediatamente después de colectada la muestra fue identificada y colocada en una caja de térmica que contenía refrigerantes para su transporte al laboratorio de la clínica. El tiempo transcurrido entre la recolección y el procesamiento en el laboratorio fue aproximadamente de 2 horas.

Prueba de Mastitis California

El CMT se realizó empleando la paleta de la prueba, la cual consiste en una bandeja de plástico dividida en cuatro cámaras. Se recolectó una muestra de leche por cuarto mamario, luego de enrasó la bandeja con la finalidad de tener 2,5 mL de leche por cámara. Luego se agregó 2,5 mL del reactivo de la prueba, que consiste en bromocresol de base violeta más un detergente (Mastitest® CMT, Agrovvet Market, Lima, Perú) y se homogenizó la mezcla realizando movimientos circulares de la bandeja durante un periodo de 10 segundos [28]. Finalmente se leyeron los resultados, como sigue: 0, para las muestras negativas, 1, para las muestras con reacción débil, 2, para las muestras reacción distinguible y 3, con reacción fuertemente positiva [3].

Determinación del conteo de células somáticas por CFI

La concentración de CS en la leche fue evaluada empleando la tinción de Sybr Green I [16]. Una solución stock de Sybr Green I fue preparada con una dilución 1:10 de Sybr Green I concentrado (Molecular probes, SYBR® Green I Nucleic Acid Gel Stain - 10,000X concentrate in DMSO S7563, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EUA) con DMSO. Se empleó una solución de ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) disódico a 500 mM, pH 8 para incrementar la permeabilidad de las células. El procedimiento de tinción fue el siguiente: las muestras de leche fueron diluidas en solución buffer salina fosfatada (PBS) (dilución final 1:50) y teñidas con Sybr Green I; para esto, las muestras fueron sometidas al siguiente procedimiento: se colocó 978 μ L de PBS en un vial de 1,5 mL, se adicionó 1 μ L de solución stock de SYBER Green, 1 μ L de Na₂EDTA a 500 mM y 20 μ L de leche; después de homogenizar, se incubó en baño maría (Baño María 116, Fanem, San Pablo, SP, Brasil) a 37 °C por 13 minutos. Transcurrido este tiempo se colocaron 200 μ L en un tubo vial para su lectura en el CFI FlowSight® (Amnis, Seattle, WA, EUA). Finalmente, las muestras previamente homogenizadas fueron adquiridas en el CFI usando el software de adquisición de imágenes Inspire® (Amnis, Seattle, WA, EUA). Durante la adquisición de las muestras se realizó el conteo de 100 000 objetos. Se empleó el láser 488 nm a 15 W y la fluorescencia del Sybr Green fue detectada en el canal 2 (505-560 nm). Luego de adquiridas las muestras, se procedió al procesamiento de las imágenes empleando el software IDEAS® (Amnis, Seattle, WA, EUA). Histogramas fueron usados para analizar la distribución de los objetos adquiridos. Las CS fueron definidas como todos aquellos objetos positivos a Sybr Green I que presentaron una intensidad superior o igual a 50000 y que presentan un área superior a 75 μ m² determinado en el campo de luz natural. Luego de determinada la población de CS, se procedió a calcular el número de CS de cada muestra, para lo cual se multiplicó el número de objetos por mL de la población de CS de la adquisición por el factor de dilución de la muestra (factor dilución: 1:50).

Análisis estadístico

Los resultados del CCS fueron reportados como media logarítmica, media geométrica e intervalo de confianza para cada puntuación de CMT. Se realizó un análisis de varianza para determinar si el CCS fue diferente para cada puntuación de CMT, un nivel de significancia de 5% fue considerado como significativo. Se calculó el coeficiente de correlación de Spearman entre el CCS y el puntaje de CMT. Se calculó la asociación entre la respuesta al CMT y a tres niveles del CCS (menos de 750 x 10³; 750 x 10³ a 1500 x 10³; más de 1500 x 10³ células por mL), para la cual se usó el coeficiente de correlación de Tau-b de Kendall [9]. Se calculó la sensibilidad y especificidad del CMT comparado con el CCS, empleando un umbral de 1000 x 10³ células por mL. Se calculó el nivel de concordancia entre ambas pruebas, empleando el índice de Kappa de Cohen. Los datos fueron analizados usando el programa estadístico informático

SPSS® 22,0 para Windows® (IBM, Armonk, NY, EUA) [9].

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La población de CS puede ser fácilmente determinada cuando las células son teñidas con Sybr Green I. En la FIG. 1A, se pudo distinguir dentro del recuadro verde, una población de CS de una muestra de leche con alto CCS, mientras que en la FIG. 1B, no se observa dicha población de CS, cuando la muestra proviene de leche con bajo CCS. En las FIGS. 1C y 1D, también se pudo observar los diferentes niveles de intensidad de fluorescencia que permiten determinar dos tipos de poblaciones en las muestras de leche adicionales a las CS. Estas poblaciones adicionales son los restos celulares (RC) y los objetos no celulares (NC).

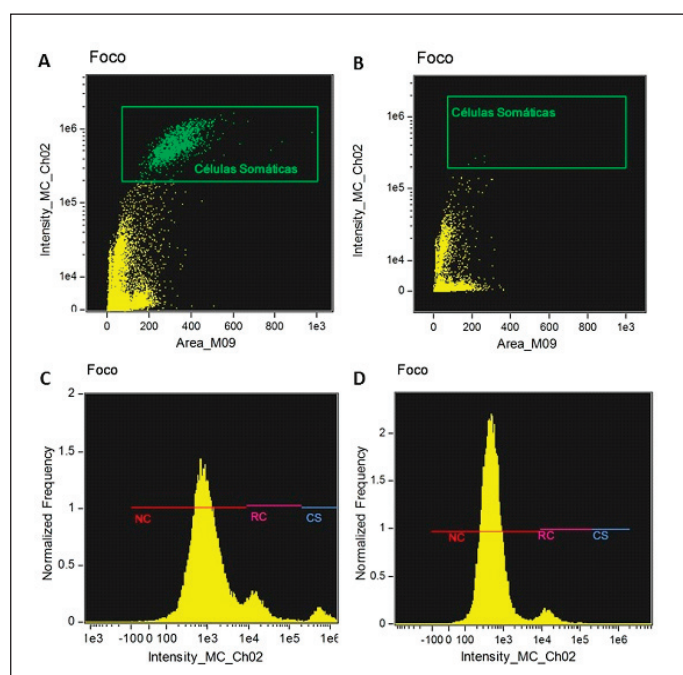


FIGURA 1. DETERMINACIÓN DE LA POBLACIÓN DE CÉLULAS SOMÁTICAS MEDIANTE LA CITOMETRÍA DE FLUJO POR IMÁGENES EMPLEANDO SYBR GREEN EN LA LECHE DE VACAS; A y C. Muestra de leche con alto conteo de células somáticas (CCS = 15 000 x 10³ Células/mL); B y D. Muestra de leche con bajo conteo de células somáticas (CCS = 180 x 10³ Células/mL); A y B. Gráfico de dispersión de puntos entre la intensidad del Sybr Green (Intensity_MC_Ch02) y el tamaño de las células (Area_M09); C y D. Histograma de frecuencia normalizada para la intensidad del Sybr Green (Intensity_MC_Ch02), con las regiones NC: no células, RC: restos celulares y CS: células somáticas.

En la FIG. 2, se puede observar las fotografías obtenidas mediante CFI. Las CS presentan fluorescencia positiva al Sybr Green I (FIG. 2A.1 y 2A.2), al igual que los RC (FIG. 2B.1 y 2B.2) y a diferencia de los objetos NC (FIG. 2C.1 y 2C.2). Sin embargo, las CS presentan mayor fluorescencia que los RC.

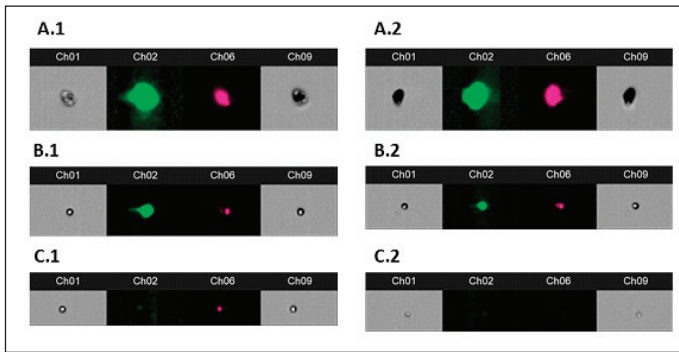


FIGURA 2. IMÁGENES OBTENIDAS MEDIANTE LA CITOMETRÍA DE FLUJO POR IMÁGENES DE LAS MUESTRAS DE LECHE, Ch01 y Ch09: Imagen obtenida con luz natural, Ch02: Imagen obtenida con la fluorescencia del Sybr Green, Ch06: Imagen obtenida con el láser de campo oscuro (785 nm); A.1 y A.2. Células somáticas; B.1 y B.2. Restos celulares; C.1 y C.2. Objetos no celulares.

En la TABLA I se presenta la relación entre la media logarítmica (log 10) y la media geométrica del CCS con el puntaje de CMT obtenidos en las muestras de leche. Para los diferentes puntajes del CMT, la media log 10 del CCS mediante la CFI fue 5,75; 5,85;

5,96; 6,04 log 10 del CCS por mL (TABLA I), sin encontrarse diferencias significativas entre los puntajes del CMT ($P > 0,05$). Asimismo, al realizarse un análisis de correlación de Spearman, el coeficiente de correlación fue de 0,26 ($P > 0,05$), el cual es un nivel de correlación bajo entre los puntajes de CMT y el CCS mediante la CFI.

En la TABLA II, se presentan la distribución de los cuartos según los diferentes puntajes de CMT y las tres diferentes clases de cuartos según el CCS (Menos de 750; De 750 a 1500 y Más de 1500 x 10³ células por mL). El análisis estadístico reveló que los resultados no estuvieron asociados, ya que el coeficiente de asociación de Tau-b de Kendall fue de 0,15 ($P > 0,05$). Así también, en la TABLA III se presenta la distribución de los cuartos según la agrupación de dos puntuaciones consecutivas de CMT (CMT 0 y 1; CMT 2 y 3) y dos diferentes clases de cuartos según el CCS (Menos de 1000; Más de 1000 x 10³ células por mL). Esto debido a que la evaluación de los puntajes de CMT es subjetiva, especialmente entre dos puntuaciones consecutivas. Bajo tales condiciones, el CMT fue más eficiente en la discriminación CCS a un nivel de 1000 x 10³ células por mL con una sensibilidad de 69,2% y una especificidad del 71,0%. (TABLA III), mostrando un coeficiente de concordancia de Kappa de Cohen de 0,36 ($P < 0,05$).

**TABLA I
RELACIÓN ENTRE LA MEDIA LOGARÍTMICA Y LA MEDIA GEOMÉTRICA DEL CONTEO DE CÉLULAS SOMÁTICAS Y EL PUNTAJE DE LA PRUEBA DE MASTITIS DE CALIFORNIA**

CMT	N	Media geométrica (x 10 ³ células por mL)	Error estándar	IC al 95%		Media logarítmica (log 10)	Error estándar	IC al 95%	
				Inf.	Sup.			Inf.	Sup.
0	21	568,50	1,80	441,78	731,54	5,75	0,26	5,65	5,86
1	5	713,15	1,87	411,74	1235,19	5,85	0,27	5,61	6,09
2	11	910,85	3,33	447,39	1854,41	5,96	0,52	5,65	6,27
3	7	1084,41	2,36	574,78	2045,92	6,04	0,37	5,76	6,31
Total	44	727,30	2,32	567,42	932,24	5,86	0,36	5,75	5,97

CMT: puntaje de obtenido a la prueba de mastitis de California; N: número de muestras según el puntaje de CMT; IC al 95%: Intervalo de confianza al 95%; Inf: Límite de inferior del IC al 95%; Sup: Límite superior del IC al 95%.

**TABLA II
DISTRIBUCIÓN DE LA CLASE DEL CONTEO DE CÉLULAS SOMÁTICAS Y EL PUNTAJE DE LA PRUEBA DE MASTITIS DE CALIFORNIA**

CMT	Menos de 750 x 10 ³ células por mL	De 750 a 1500 x 10 ³ células por mL	Más de 1500 x 10 ³ células por mL	Total
0	12	8	1	21
1	2	2	1	5
2	6	2	3	11
3	3	2	2	7
Total	23	14	7	44

CMT: puntaje de obtenido a la prueba de mastitis de California.

TABLA III
DISTRIBUCIÓN DE LAS CLASES DEL CONTEO DE CÉLULAS SOMÁTICAS
Y LOS PUNTAJES 0, 1 Y 2, 3 DE LA PRUEBA DE MASTITIS DE CALIFORNIA

CMT	Menos de 1000 x 10 ³ células por mL	Más de 1000 x 10 ³ células por mL	Total
0 y 1	22	4	26
2 y 3	9	9	18
Total	31	13	44

CMT: puntaje de obtenido a la prueba de mastitis de California.

Los resultados de este estudio muestran una pobre correlación entre el CMT y el CCS mediante la CFI (R=26%). Esto indica que la variabilidad de los resultados de la prueba de CMT son explicados parcialmente por los CCS (R²=51%). Esto puede deberse a la subjetividad diagnóstica del CMT [3]. La baja sensibilidad del CMT ha sido reportada también por otros autores que, comparando sus resultados con otras pruebas, concluyen que la sensibilidad del CMT nunca fue mayor a 60% [10]. Sin embargo, a pesar de su baja sensibilidad, el CMT se sigue utilizando por su simplicidad a pesar de existir una serie de métodos y pruebas que evalúan lo mismo [4, 6, 14].

Como se puede observar en la FIG. 1, tanto las muestras con altos CCS (FIG. 1A y 1C) como las de bajos CCS (FIG. 1B y 1D) presentan una población de RC, que pueden influir en el resultado de CMT, debido a que su positividad depende de la cantidad de ADN que interactúa con el bromocresol de base violeta presente en el reactivo del kit diagnóstico [14, 19]. Sin embargo, CCS mediante la CFI permite discriminar el ADN que se encuentra en el interior de las células del ADN proveniente de los RC con gran facilidad (FIG. 1). Estos RC presentan cierta cantidad de ADN en su interior que puede reaccionar con el reactivo del CMT, haciendo que el CMT sea difícil de interpretar y presente baja sensibilidad [28].

Se empleó la CFI como un método de referencia porque se ha demostrado que la CFI posee un enfoque diagnóstico válido, que proporciona resultados comparables a los de la citología manual y es muy confiable para detectar muestras verdaderamente negativas al CCS. Siendo incluso posible el uso de los índices de citometría para desarrollar algoritmos relacionadas con la salud de la glándula mamaria [13, 18]. Es importante mencionar que el CCS a través de la CFI se realizó en las muestras de leche sin necesidad de centrifugar la muestra. Esto permite su cuantificación y evita que las CS sean eliminadas con la grasa de la leche durante el proceso de centrifugación. En este estudio se empleó el mismo principio que usa en el CCS mediante Fossomatic® [10, 28], el cual consiste en emplear una sonda marcadora del ADN para identificar y contabilizar las CS presentes en la leche [28]. La ventaja de la CFI sobre el Fossomatic es que permite visualizar las CS (FIG. 2). Por lo cual, la CFI es un método preciso y reproducible para evaluar el número total de CS

presentes en la leche de diferentes especies [13].

Por otro lado, el presente trabajo no encontró diferencias significativas entre las medias logarítmicas del CCS de los diferentes puntajes de CMT, ni entre las medias geométricas del CCS de los diferentes puntajes de CMT. Lo cual indica que el resultado del CMT no se relaciona con el CCS en la leche (TABLA I), contando con un coeficiente de correlación de 0,26 (P>0,05), el cual es bastante bajo. Igualmente se encontró que el coeficiente de asociación de Tau-b de Kendall entre ambas pruebas es bastante bajo (0,15, P>0,05), cuando se asocian los cuatro puntajes de la prueba de CMT con tres rangos del CCS. La poca asociación entre el CMT y el CCS mediante CFI puede deberse a que el CMT es de evaluación subjetiva y a pesar de su simplicidad, su interpretación necesita de entrenamiento [28]. Además, el parámetro de evaluación del CMT, que es la viscosidad producida por la mezcla de la leche y el reactivo, varía dependiendo de la cantidad de reactivo en la mezcla y es afectada por el pH de la leche [26].

Sin embargo, cuando se evalúa la asociación entre ambas pruebas, empleando sólo positivos o negativos al CMT y dos rangos del CCS, considerando como punto de corte el número de 1000 x 10³ células por mL [2], en el presente trabajo se obtuvo una sensibilidad de 69,2% y una especificidad del 71,0%. (TABLA III), contando con un coeficiente de concordancia de Kappa de Cohen de 0,36 (P<0,05). Estos resultados demuestran que el CMT presenta muchas limitaciones, sin embargo, es la prueba barata, accesible y útil para el ganadero [3].

CONCLUSIONES

El CMT permite discriminar CCS por encima de un nivel de 1000 x 10³ células por mL, encontrándose una sensibilidad de 69,2% y una especificidad del 71,0%. Sin embargo, cuando el CCS por mL es menor, se encuentra un coeficiente de correlación muy bajo (Spearman fue de 0,26) y poca asociación (Tau-b de Kendall fue de 0,15) entre los resultados del CMT y el CCS por CFI. Por lo tanto, los resultados del presente trabajo sugieren que la CFI puede ser una buena alternativa y una herramienta complementaria para evaluar la salud de la ubre.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] ATAKAN, K. A study of somatic cell counts in the milk of Holstein-Friesian cows managed in Mediterranean climatic condition. **Turkis. J Vet. Anim. Sci.** 32: 13-18. 2008.
- [2] BYTYQI, H; ZAUGG, U; SHERIFI, K; HAMIDI, A; GJONBALAJ, M; MUJI, S; MEHMETI, H. Influence of management and physiological factors on somatic cell count in raw milk in Kosova. **Vet. Archiv.** 80: 173-183. 2010.
- [3] DA COSTA, ADC; DOS SANTOS, JS; ZANOL, D; LOMBARDE, LNL; BRUZAROSKI, SR; LUDOVICO, A; DE SANTANA, EHW. Evaluation of an electrical conductivity portable device as an alternative for subclinical mastitis detection. **Rev. Salud Anim.** 38: 131-135. 2016.
- [4] DE VIEGHER, S; BARKEMA, HW; STRYHN, H; OPSOMER, G; DE KRUIF, A. Impact of early lactation somatic cell count in heifers on milk yield over the first lactation. **J. Dairy Sci.** 88: 938-947. 2005.
- [5] DIESER, SA; VISSIO, C; LASAGNO, MC; BOGNI, CI; LARRIESTRA, AJ; ODIERNO, LM. Prevalence of pathogens causing subclinical mastitis in Argentinean dairy herds. **Pak. Vet. J.** 34: 124-126. 2014.
- [6] DINGVELL, RT; LESLIE, KE; SCHUKKEN, YH; SARGEANT, JM; TIMMS, LL. Evaluation of the California mastitis test to detect an intramammary infection with a major pathogen in early lactation dairy cows. **Can. Vet. J.** 44: 413-416. 2003.
- [7] DÜRR, JW; CUE, RI; MONARDES, HG; MORO-MÉNDEZ, J; WADE, KM. Milk losses associated with somatic cell counts per breed, parity and stage of lactation in Canadian dairy cattle. **Livest. Sci.** 117: 225-232. 2008.
- [8] HAGNESTAM-NIELSEN, C; EMANUELSON, U; BERGLUND, B; STRANDBERG, E. Relationship between somatic cell count and milk yield in different stages of lactation. **J. Dairy Sci.** 93: 3124-3133. 2009.
- [9] HINTON, PR; MCMURRAY, I; BROWNLOW, C. Linear correlation In: **SPSS explained.** Routledge, East Sussex. 372 pp. 2014.
- [10] HOLDAWAY, R. A comparison of methods for the diagnosis of bovine subclinical mastitis within New Zeland dairy herds. Massey University, Thesis of Grade. 393 pp. 1990.
- [11] KAŞIKCI, G; CETIN, O; BINGOL, EB; GUNDUZ, MC. Relations between electrical conductivity, somatic cell count, California mastitis test and some quality parameters in the diagnosis of subclinical mastitis in dairy cows. **J. Vet. Anim. Sci.** 36: 49-55. 2012.
- [12] LAFI, SQ. Use of somatic cell counts and California Mastitis Test results from udder halves milk samples to detect subclinical intramammary infection in Awassi sheep. **Small Rum. Res.** 62: 83-86. 2006.
- [13] LI, N; RICHOUX, R; PERRUCHOT, MH; BOUTINAUD, M; MAYOL, JF; GAGNAIRE, V. Flow Cytometry Approach to Quantify the Viability of Milk Somatic Cell Counts after Various Physico-Chemical Treatments. **PloS One.** 10: e0146071. 2015.
- [14] MIDDLETON, J; HARDIN, D; STEEVENS, B; RANDLE, R; TYLER, J. Use of somatic cell counts and California mastitis test results from individual quarter milk samples to detect subclinical intramammary infection in dairy cattle from a herd with a high bulk tank somatic cell count. **JAVMA.** 224: 419-423. 2004.
- [15] MIDDLETON, JR; SAEMAN, A; FOX, LK; LOMBARD, J; HOGAN, JS; SMITH, KL. The National Mastitis Council: A Global Organization for Mastitis Control and Milk Quality, 50 Years and Beyond. **J. Mammary Gland. Biol. Neoplasia** 19: 241-251. 2014.
- [16] PILLAI, R; KUNZE, E; SORDILLO, L; JAYARAO, B. Application of differential inflammatory cell count as a tool to monitor udder health. **J. Dairy Sci.** 84: 1413-1420. 2001.
- [17] PILLA, R; SCHWARZ, D; KÖNIG, S; PICCININI, R. Microscopic differential cell counting to identify inflammatory reactions in dairy cow quarter milk samples. **J. Dairy Sci.** 94: 4410-4420. 2012.
- [18] RIVAS, A; QUIMBY, F; BLUE, J; COKSAYGAN, O. Longitudinal evaluation of bovine mammary gland health status by somatic cell counting, flow cytometry, and cytology. **J. Vet. Diagn. Invest.** 13: 399-407. 2001.
- [19] SARGEANT, J; LESLIE, K; SHIRLEY, J; PULKRABEK, B; LIM, G. Sensitivity and Specificity of Somatic Cell Count and California Mastitis Test for identifying intramammary Infection in Early Lactation. **J. Dairy Sci.** 84: 2018-2024. 2001.
- [20] SCHWARZ, D; DIESTERBECK, US; KOENIG, S; BRUEGEMANN, K; SCHLEZ, K; ZSCHOECK, M; WOLTER, W; CZERNY, CP. Microscopic differential cell counts in milk for the evaluation of inflammatory reactions in clinically healthy and subclinically infected bovine mammary glands. **J. Dairy Res.** 78: 448-455. 2011.
- [21] SCHWARZ, D; DIESTERBECK, US; KOENIG, S; BRUEGEMANN, K; SCHLEZ, K; ZSCHOECK, M; WOLTER, W; CZERNY, CP. Flow cytometric differential cell counts in milk for the evaluation of inflammatory reactions in clinically healthy and subclinically infected bovine mammary glands. **J. Dairy Sci.** 94: 5033-5044. 2011.

- [22] SEARS, PM; GONZÁLEZ, RN; WILSON, DJ; HAN, HR. Procedures for mastitis diagnosis and control. **Vet. Clin. North Ame.: Food Anim. Pract.** 9: 445-468. 1993.
- [23] SHARMA, N. Alternative approach to control intramammary infection in dairy cows- A review. **Asian J. Anim. Vet. Adv.** 2: 50-62. 2007.
- [24] SHARMA, N; PANDEY, V; SUDHAN, NA. Comparison of some indirect screening tests for detection of subclinical mastitis in dairy cows. **Bulg. J. Vet. Med.** 13: 98-103. 2010.
- [25] SHARMA, N; SINGH, N; BHADWAL, M. Relationship of Somatic Cell Count and Mastitis: An Overview. **Asian-Aust J. Anim. Sci.** 24: 429-438. 2011.
- [26] ŠPAKAUSKAS, V; KLIMIENĖ, I; MATUSEVIČIUS, A. A comparison of indirect methods for diagnosis of subclinical mastitis in lactating dairy cows. **Vet. Archiv.** 76: 101-109. 2006.
- [27] VARSHNEY, JP; NARESH, R. Evaluation of homeopathic complex in the clinical management of udder diseases of riverine buffaloes. **Homeopathy**, 93:17. 2004.
- [28] VIGUIER, C; ARORA, S; GILMARTIN, N; WELBECK, K; O'KENNEDY, R. Mastitis detection: current trends and future perspectives. **Trends in Biotechnol.** 27: 486-493. 2009.
- [29] VISSIO, C; AGÜERO, DA; RASPANTI, CG; ODIERNO, LM; LARRIESTRA, AJ. Pérdidas productivas y económicas diarias ocasionadas por la mastitis y erogaciones derivadas de su control en establecimientos lecheros de Córdoba, Argentina **Arch. Med. Vet.** 47: 7-14. 2015.