

Factores ambientales asociados y métodos de determinación de células somáticas en leche de tanque

Associated environmental factors and determination methods for somatic cell in the milk tank

Fatores ambientais associados e métodos para a determinação de células somáticas do tanque de resfriamento de leite

JORGE GUERRERO-QUICENO¹, RÓMULO CAMPOS-GAONA²,
MAURICIO VÉLEZ-TERRANOVA³

RESUMEN

Con el fin de analizar factores ambientales asociados a los sistemas de producción de leche y comparar el efecto de cuatro métodos de análisis para recuento de células somáticas (RCS) en tanque se realizó una prueba de campo en 30 hatos con diferentes condiciones de manejo en el Valle del Cauca (Colombia). La prueba se realizó en cuatro períodos; se evaluó el efecto de la época de muestreo (períodos), tipo de ordeño, zona alta o baja, implementación de buenas prácticas ganaderas (BPG), componente racial,

Recibido para evaluación: 6 de enero de 2017.

Aprobado para publicación: 11 de Abril de 2018.

- 1 Cooperativa de Ganaderos del Centro del Valle, Magíster en Ciencias Agrarias, Línea Producción Animal. Tuluá, Colombia
- 2 Universidad Nacional de Colombia, Departamento de Ciencia Animal. Doctor en Ciencias Veterinarias. Palmira, Colombia
- 3 Universidad Nacional de Colombia, sede Arauca. Doctor en Ciencias Agropecuarias. Arauca, Colombia

Correspondencia: rcamposg@unal.edu.co

alimentación con pollinaza, recuento de patógenos totales y número total de vacas en ordeño sobre el RCS. Se realizó análisis multivariado para variables ambientales y adicionalmente pruebas específicas para diferenciar los métodos diagnósticos (Direct Cell Counter (DCC), Ekomilk Scan, Portacheck y Fossomatic), la capacidad de comparación frente a la prueba padrón y las posibilidades de ajustes matemáticos para evaluar criterios de discriminación, finalmente se empleó el análisis ROC (de las siglas en inglés Receiver Operating Characteristic), Se concluye en forma general, que existen factores ambientales que inciden en el RCS; frente a los equipos las pruebas presentan diferencias significativas entre ellas; a nivel de precisión en relación con la prueba testigo.

ABSTRACT

In order to analyze the main environmental factors associated with the milk production systems and the somatic cell count (SCC) in tank and, compare the effect of the four analysis methods for the determination of somatic cells, a field trial was conducted in 30 herds with different management conditions in Valle del Cauca (Colombia). The test was carried out in four periods, the effect of the sampling period (periods), type of milking, high or low altitude, implementation of good livestock practices, racial component, feeding with poultry dregs, total pathogen count and total cows number were evaluated for the SCC. Multivariate analysis was carried out for environmental variables and specific tests to differentiate the four diagnostic methods (Direct Cell Counter, Ekomilk Scan, Portacheck and Fossomatic), the comparison capacity against the standard test and the possibilities of mathematical adjustments to evaluate discrimination criteria, finally the ROC (Receiver Operating Characteristic) analysis was used, It is concluded that there are environmental factors that affect the SCC; the tests show significant differences between them; at the level of precision compared to the witness test.

RESUMO

Objetivou-se avaliar os principais efeitos ambientais associados aos sistemas de gado de leite e ao recuento de células somáticas no tanque e, diferenciar o efeito dos métodos de análises para a determinação de células somáticas foi testada uma prova de campo em trinta rebanhos sob diferentes condições de manejo no Valle del Cauca (Colômbia). O teste foi feito em quatro períodos, o efeito do tipo de ordenha, altitude alta ou baixa, implementação de boas práticas de ordenha, tipo de raça, alimentação com resíduos da indústria aviária, numero total de patógenos isolados e numero total de vacas em ordenha foram avaliados para RCS. Foi feito Multivariate teste para variáveis ambientais e análises específicas para diferenciar os métodos diagnósticos (Direct Cell Counter, Ekomilk Scan, Portacheck y Fossomatic), capacidade de descrici-nação contra a prova testemunha, ajuste matemáticos entre as provas, e no final analise ROC (Receiver Operating Characteristic) foi efetuado. A conclusão é que existe diferença entre os fatores ambientais. O analise estatístico apresenta diferencias entre as provas, sua precisão e nível de sensibilidade.

PALABRAS CLAVE:

Patología mamaria,
Ganado lechero,
Calidad de Leche.

KEYWORDS:

Animal mammary,
Dairy cows,
Quality Milk.

PALAVRAS-CHAVE:

patologia mamaria,
Vacas leiteiro,
Qualidade do Leite.

INTRODUCCIÓN

El RCS se ha tornado en los últimos años, en un recurso para evaluar el impacto de las mastitis subclínicas, la calidad de la leche y la salud general de la glándula mamaria [1]. Los sistemas productivos en condiciones de trópico bajo presentan diversos factores asociados a la mayor o menor incidencia de células somáticas. Origen racial, manejo nutricional, tipo de ordeño, época del año, localización del hato, han sido descritos en la literatura como factores asociados a la prevalencia de mastitis; por otra parte, el tipo de patógenos y la cantidad de estos que puedan ser aislados en pruebas microbiológicas también se asocian al RCS.

A través del tiempo, la necesidad de contar con técnicas diagnósticas confiables, exactas, sensibles y precisas para conocer la epidemiología de la mastitis, llevó a emplear sistemas cuantitativos para la detección de las células somáticas. Se considera que la mejor forma de realizar con exactitud un RCS es contarlas en un Microscopio en laboratorio, lo cual es extremadamente lento; por esto, el desarrollo de equipos automáticos, permitió contar con una ayuda diagnóstica para procesar un alto número de muestras por hora. El principio técnico del Fossomatic (FOSS) (citometría de flujo), permite tener alta precisión y capacidad para determinar células o componentes celulares [2]. Se han desarrollado equipos menos robustos que ofrecen la posibilidad de ser usados *in situ*, por ejemplo el PortaCheck® (PCHECK) basado en la reacción enzimática de la esterase presente en las células somáticas [3]. El DeLaval Cell Counter (DCC), cuenta las células automáticamente a través de una cámara digital, mediante tinción fluorescente específica para el ADN [4]. Por último, el Ekomilk Scan (EKOMS) se basa en el principio de viscosidad y junto con el Ekoprim surfactante que disuelve la membrana de las células, forma un gel y eleva la viscosidad de la muestra de leche en la medida de mayor RCS [5].

Estudiar la incidencia del RCS en mastitis y su relación en procesos productivos constituye un área importante en la clínica veterinaria y en la industrialización de la leche; la incidencia de la mastitis ha llevado a utilizar pruebas individuales bien sea por vaca o por pezón, pero, los sistemas de producción de leche requieren en algunos casos apreciaciones generales sobre el estado de salud del hato y la seguridad de cumplir estándares exigidos por la industria láctea sobre

la calidad del producto en el marco de cadenas productivas, por esto la determinación del RCS en leche de tanque es una práctica que permite tomar decisiones técnicas y gerenciales enfocadas a disminuir las pérdidas económicas ocasionadas por la mastitis [6].

Múltiples factores pueden influenciar el RCS de tanque, entre estos, el de mayor impacto es el nivel de inflamación que presenta la glándula mamaria, ocasionada por patógenos o por factores asociados al manejo del sistema productivo y algunas condiciones medioambientales, tales como: localización, precipitación, componentes de la dieta, origen racial, tipo y manejo de ordeño [7]. Estas condiciones de producción fueron estudiadas para los principales sistemas de ganadería de leche ubicados en la zona media y baja de la ecoregión Valle del Cauca. Así mismo, se analizaron cuatro equipos existentes en el mercado para realizar el RCS, con el fin de estudiar el comportamiento de estos instrumentos cuantitativos y semicuantitativos.

El objetivo del presente trabajo consistió en determinar las principales causas de variación en el RCS en sistemas de producción comerciales, sujetos a diferentes condiciones de manejo, y comparar cuatro métodos empleados en el análisis de células somáticas en condiciones del trópico bajo colombiano.

MÉTODO

Localización del estudio y Animales

El estudio fue realizado en el Valle del Cauca allí se escogieron aleatoriamente 30 hatos; ubicados entre los 900 y 1800 msnm, humedad relativa 72-80%, temperatura 24 a 27°C y una precipitación anual promedio histórico de 1120 mm [8]. Los hatos no modificaron las condiciones de manejo durante el experimento. Las variables incluidas en el estudio fueron: localización (altura sobre el nivel del mar), época del año (lluvias, transición o verano), el número de vacas en ordeño (cuatro categorías de 1-50 animales, 51 a 100, 101 a 200 y > 200 vacas), tipo de ordeño (manual o mecánico), origen racial, certificación o no en BPG y si alimentaban con pollinaza o no. Otras variables tenidas en cuenta fueron los resultados de los análisis de laboratorio como tipo y cantidad de patógenos identificados. La producción individual de leche o por lactancia no se consideró debido a que se procesó leche de tanque.

Equipos para RCS

PortaCheck® - PortaSCC milk test™ (PCHECK) - Moorestown, USA. Utiliza la técnica basada en la reacción enzimática de la esterase presente en las células somáticas. Kit diagnóstico para análisis semicuantitativo (ref 1K100 de 2006 (USA).

Delaval Cell Counter DCC® (DCC) - DeLaval Equipos SA - Irlanda. Equipo portátil con lector directo basado en el principio de tinción fluorescente específica para el ADN, en cámara individual Exactitud entre 7-12%.

Ekomilk Scan (EKOMS) - Bulteh 2000, Bulgaria. Equipo manual cuyo principio es un surfactante comercial "Ekoprim" que disuelve la membrana celular y nuclear y genera la viscosidad a ser leída. Exactitud \pm 15%.

Fossomatic® (FOSS) - Fossomatic cell counter- Dinamarca. Técnica cuya base es la citometría de flujo, con el método de microscopía de fluorescencia directa con tinción del ADN celular con bromuro de etidio. Exactitud 2-3,5%. Certificación ISO 13366 - 1:2008 (IDF 148-1: 2008) para RCS.

Procedimiento Analítico

Las muestras se manejaron según los manuales específicos de cada equipo y técnica. Las pruebas se realizaron simultáneamente. Para PCHECK se tomó una gota de leche con pipeta y se depositó sobre el pozo de una tirilla del kit del PortaCheck®. Se adicionaron tres gotas de reactivo de PortaCheck® sobre el pozo. Se esperaron 45 min y se leyó en el medidor electrónico. El valor hallado se multiplicó por un millón y éste fue el resultado del RCS.

Adicionalmente, se comparó manualmente el color de la reacción en la tirilla con la tabla de referencia y ésta arrojó un valor similar al reportado por el equipo [3]. Para el análisis con el DCC fueron aspirados 0,6 mL por el cassette, posteriormente el cassette se colocó en el equipo de lectura que emite un haz de luz y permite al equipo hacer lectura de la muestra y contar las células individuales. El tiempo de lectura por muestra fue de 45 s, presentándose el resultado en células.mL⁻¹, este valor se multiplicó por 1000 (constante) para determinar el RCS. Para EKOMS las muestras se mezclan 10 mL de leche con 5 mL del surfactante "Ekoprim". El analizador Ekomilk Scan mide el tiempo que toma el conjunto de muestra

para pasar a través de un capilar ubicado en el módulo de mezcla de la muestra, así determina el número de células por regresión con el tiempo. La medición de la viscosidad es sensible a la temperatura. El valor arrojado por el equipo se multiplicó por 1000 para obtener el valor del RCS. El intervalo de detección se sitúa entre 90 y 2200 células.mL⁻¹; el tiempo de lectura oscila entre 10 a 55 s y varía en razón del número de células detectado [5].

Para el procedimiento con FOSS fueron enviadas muestras de leche en tubo con conservante bronopol (2-bromo-2-nitropropano-1,3-diol) al laboratorio de la Universidad de Antioquia. El FOSS efectúa el RCS mediante el método de citometría directa emitiendo fluorescencia de color rojo, la que es detectada por el equipo para realizar el conteo de cada una de las células [9]. Además de la precisión, este equipo analiza un gran número de muestras por hora. Estas razones y el hecho de ser considerada en la actualidad como la prueba referencia por su precisión y sensibilidad [2], llevaron a que en el presente trabajo se seleccionara como prueba testigo o de comparación.

Finalmente, Se realizó aislamiento de patógenos por cultivo microbiológico completo, proceso realizado en el laboratorio de calidad de leche, de la Universidad de Caldas, el informe de laboratorio se tabuló por tipo y número de patógenos.

Diseño Experimental

El estudio se llevó a cabo en 30 fincas, en las cuales se realizaron muestreos en cuatro periodos, generando un total de 120 observaciones en cada variable. Para reducir la variabilidad de la información, los valores de los RCS fueron transformados y analizados en escala logarítmica ($\log_{10} X$, donde x es el número de células somáticas). En una primera fase, se evaluó el efecto del total de las variables y de los tratamientos que correspondieron a los métodos analíticos para RCS (DCC=Direct Cell Counter, EKOMS=Ekomilk Scan, PCHECK=PortaCheck y FOSS=Fossomatic); los efectos ambientales analizados fueron: época de muestreo (1=seca; 2= lluviosa; 3 = transición seca-lluviosa; 4= transición lluviosa-seca), tipo de ordeño (1>manual; 2=mecánico), zona (1=alta; 2=baja), implementación de buenas prácticas ganaderas (1=sí; 2=no), componente racial (1=menor 50% de *Bos taurus -alto componente Bos indicus-*; 2= mayor al 50% de *Bos taurus*), alimentación con pollinaza (1=sí; 2=no), recuento de patógenos totales (1= entre 4

y 5; 2=6 y 3= > 6) y número total de vacas en ordeño (cuatro categorías 1: de 1-50, 2: 51-100, 3: 101-200 y 4: > 200), sobre el RCS. La información se analizó a través de un modelo mixto, considerando las fincas evaluadas como variable aleatoria, para la diferenciación de medias, se usó la prueba de promedios LSD (Least significant differences $Pr < 0,05$).

En una segunda fase, se analizó el grado de similitud entre las estimaciones de RCS obtenidas con las metodologías analíticas: DCC, EKOMS y PCHECK en comparación con los valores de la técnica FOSS, método considerado como referente en el presente estudio. Para ello, se estimaron correlaciones de Pearson entre los tratamientos evaluados, y además, se realizó un análisis de concordancia metodología desarrollada [10] y utilizada principalmente en las ciencias biomédicas para la comparación de mediciones entre 2 equipos. El análisis se basó en los siguientes componentes:

1. Un gráfico en donde se relacionan las diferencias entre las estimaciones de los métodos comparados y el promedio de cada observación. Los gráficos se complementaron con la construcción de límites de concordancia al 95% para la media de las diferencias, los cuales son útiles para identificar cuan distantes se encuentran las mediciones realizadas por los dos métodos. Si las mediciones son comparables, las diferencias deben ser pequeñas, centradas alrededor de cero y sin variación sistemática. La media de las diferencias y la desviación estándar, indican el sesgo estimado, y las fluctuaciones aleatorias con respecto a la media, respectivamente. Si el valor de la desviación estándar de las diferencias es lo suficientemente bajo, las mediciones son comparables [11].

2. Estimación del coeficiente de correlación esperado entre las diferencias y el promedio de cada observación a través de la ecuación 1:

$$\text{Corr}(C - E, E) = \frac{r\sigma_N^2 - \sigma_{EC}^2}{\sqrt{\sigma_N^2 + \sigma_C^2 - 2r\sigma_N\sigma_C}} \quad (\text{Ec. 1})$$

Fórmula 1: "E" identifica el método de referencia, "C" identifica el método a comparar, y "r" es la correlación de Pearson entre las técnicas. Una correlación de 0 indica que las varianzas de los dos métodos comparados son iguales, por esta razón, una correlación baja indica alta concordancia entre las técnicas, mientras que una correlación alta sugiere alta variabilidad entre las dos metodologías [10].

El análisis anterior se complementó con estudios denominados "Problemas de calibración" [11]. El objetivo de este análisis es usar el valor de RCS obtenido con el método que se está comparando (DCC, EKOMS y PCHECK), para estimar el valor que se podría obtener con el método referente (FOSS), mediante regresiones lineales. No obstante, es de resaltar que una de las asunciones de las regresiones es que las variables independientes se miden sin error, por lo que el método referente el cual se asume tiene un menor error asociado, debe ser siempre considerado como el término independiente. Además, el hecho de intercambiar variables predictoras con las de respuesta puede generar estimaciones sesgadas en los parámetros [11], por esta razón, el principio básico es usar regresiones inversas, donde se relacionan las mediciones de las técnicas que están siendo comparadas (Y) con los valores de la técnica referente (X) con el objetivo de obtener las estimaciones por mínimos cuadrados de los parámetros de la ecuación con la forma $C = b_0 + b_1E$. Finalmente, con la intención de poder hacer predicciones del comportamiento de la técnica referente, la ecuación es invertida quedando de la forma $E = (C - b_0) / b_1$.

Finalmente, se utilizó la metodología de curva ROC (receiver operating characteristic), disponible en el software SPSS Versión 24, para evaluar la capacidad de los métodos en prueba (DCC, EKOMS y PCHECK) para discriminar entre altos y bajos RCS, tomando como referente los valores obtenidos con el método estándar (FOSS), los cuales se categorizaron para formar dos grupos de altos y bajos RCS, utilizando como punto de corte el valor de la mediana, que en este caso correspondió al valor en escala logarítmica de 5,55 (Valores por encima o por debajo de este punto conformaban los grupos de altos y bajos RCS, respectivamente). Posteriormente, se construyó una curva ROC para determinar la sensibilidad (probabilidad de tener altos RCS tanto con el método estándar como en el de prueba) y especificidad (probabilidad de tener bajos RCS tanto con el método estándar como en el de prueba) en todos los posibles puntos de corte para cada uno los métodos en prueba. Para ello, en la curva ROC se relacionó en el eje Y los valores de sensibilidad, y en el eje X, los valores obtenidos como 1- especificidad (probabilidad de que los RCS fueran categorizados como bajos con el método estándar, pero que los métodos de prueba los clasificaron como altos). Para determinar la capacidad discriminativa de los métodos en prueba, se buscó una sensibilidad cercana a 1 y un valor de 1- especificidad cercano a 0, y para ello se estimó el parámetro conocido como área bajo la

curva. Finalmente, en cada método de prueba se calcularon los puntos de corte donde se alcanzó la mayor sensibilidad y especificidad, utilizando el índice de Youden, calculado según la fórmula (sensibilidad + especificidad - 1) [12].

RESULTADOS

Se analizaron variables de tipo ambiental que han sido estudiadas por su efecto sobre el RCS [6]. En general, todas las variables ambientales evaluadas influyeron significativamente sobre el RCS ($Pr < 0,05$ - Cuadro 1). Se asumió que en el experimento las condiciones de higiene de ordeño son las comúnmente aceptadas y no se tomó ésta como una variable independiente; tampoco se incluyó como variable la edad de las vacas, dado que el muestreo se obtuvo a partir de leche de tanque. Para todas las variables se relaciona el RCS en células. ml^{-1} , correspondiente a la media del antilog (número de células del RCS), como se muestra en el cuadro 1.

En la variable número de vacas en ordeño, se hallaron valores de RCS (células. ml^{-1}) entre 269.277 y 367.029, con mayores RCS asociados a aquellos sistemas que contaban con más de 50 vacas en producción ($Pr < 0,05$). Aunque es de resaltar que, en la muestra de fincas analizadas, el 47% tenían menos de 50 vacas y 23% entre 50 y 100 vacas. A nivel nacional igualmente el 60% de los hatos tienen menos de 50 vacas en ordeño [13]. Otros resultados encontrados, indican que los aumentos en el RCS se deben a diversas variables y no al número de vacas o volumen de leche producida en el hato [14]. Las vacas con altas producciones

Cuadro 1. Relación de las variables relacionadas con el RCS con sus medidas estadísticas descriptivas.

Variable	Media ($\log_{10}x$)	EE	Media (antilog)	EE	p-valor
Vacas ordeño					
1 a 50	5,43	0,04 ^b	269.277	11,1	0,0347
51 a 100	5,54	0,06 ^a	349.301	11,16	
101 a 200	5,54	0,06 ^a	343.005	11,16	
>200	5,56	0,05 ^a	367.029	11,13	
Ordeño					
Manual	5,69	0,06 ^a	491.247	1,14	<0,0001
Mecánico	5,35	0,05 ^b	221.462	1,11	
BPG					
Si	5,66	0,06 ^a	452.272	1,16	<0,0001
No	5,38	0,05 ^b	240.602	1,12	
Pollinaza					
Si	5,58	0,06 ^a	377.833	1,14	0,003
No	5,46	0,04 ^b	288.005	1,1	
Origen racial					
B. taurus > 50%	5,59	0,05 ^a	386.011	1,11	0,0007
B. taurus < 50%	5,45	0,05 ^b	281.903	1,13	
Localización					
Alta	5,62	0,04 ^a	414.000	1,11	<0,0001
Baja	5,42	0,06 ^b	262.845	1,15	
Época					
Seca	5,43	0,05 ^b	267.609	1,13	0,0056
Lluviosa	5,55	0,05 ^a	357.026	1,13	
lluvias-verano	5,54	0,05 ^a	347.536	1,13	
Verano-lluvias	5,55	0,05 ^a	356.615	1,13	
Total patógenos					
4 a 5	5,43	0,05 ^b	268.844	1,13	0,0009
6	5,53	0,05 ^a	342.058	1,13	
≥ 6	5,59	0,05 ^a	390.301	1,12	
Análisis RCS					
DCC	5,59	0,05 ^a	385.922	1,13	0,0027
PCHECK	5,53	0,05 ^a	340.095	1,13	
FOSS	5,51	0,05 ^{ab}	325.912	1,13	
EKOMS	5,44	0,05 ^b	276.758	1,13	

de leche tienen mayor tendencia a la presentación de mastitis [15], esto tendría incidencia en el volumen total de leche acopiada en tanque y mayores RCS según se ha descrito [14 y 15].

El ordeño manual, también generó altos RCS en comparación con el ordeño mecánico (491.247 Vs

221.462, respectivamente). Estos resultados concuerdan con [16] en donde de 55 muestras con RCS mayores de 500.000 células/ml, el 70% provenían de sistemas con ordeño manual. Este tipo de ordeño presenta alto riesgo de infección posiblemente por el contacto directo entre el operador y el animal [17].

Por otro lado, la implementación de buenas prácticas ganadera en los sistemas, a diferencia de lo esperado, generó mayores RCS ($Pr < 0,05$) en comparación con los hatos no certificados (452.272 vs 240.602, respectivamente). Es necesario destacar, que en el Valle del Cauca solo el 0,06% de los hatos son certificados, por lo que es posible que el bajo número de hatos no sea representativo de lo que puede impactar la certificación en un programa de calidad de leche como si lo demostraron, en trabajos realizados en dos zonas de Colombia que contaban con mayor número de hatos certificados [7]; los autores afirman que se espera un menor RCS en lecherías especializadas cuando se implementan buenas prácticas ganaderas. Igualmente, otros autores a través de un meta análisis, encontraron que cuando se cumplen los procesos y protocolos en la rutina de ordeño la incidencia de mastitis es menor, por lo tanto se obtienen menores RCS [18].

La alimentación con pollinaza es una práctica que cada vez es más frecuente entre los productores de la región, ésta generó altos RCS ($Pr < 0,05$). El uso de pollinaza incrementó en promedio los RCS en 377.833 en comparación con hatos que no la utilizan, los cuales presentaron valores promedios de 288.005. La misma respuesta fue encontrada en otro trabajo, donde la suplementación del 40% de pollinaza incrementó los RCS [19]. Lo anterior sugiere, que el uso de este residuo es un factor de riesgo que posiblemente influye sobre la mayor frecuencia de casos de mastitis y por ende en mayores RCS a nivel de tanque.

Por su parte, el efecto de componente racial también influyó sobre los RCS. Los menores recuentos estuvieron asociados a grupos genéticos con un mayor componente *Bos indicus* con valores promedio de 281.903, en comparación con razas que presentaban un mayor componente *Bos taurus* (386.011). Así mismo, otros trabajos mencionan factores asociados a altos RCS en trópico [14]. El origen racial, puede presentar predisposición genética para altos RCS o mayor susceptibilidad a mastitis, asociadas a ciertas características anatómicas como el tamaño de los pezones, debilidad de ligamentos y ubres desbalanceadas, como se describe en otros trabajos [20].

La zona agroecológica fue otro factor que modificó los RCS ($Pr < 0,05$). Los hatos ubicados en zonas altas presentaron los mayores RCS en comparación con los de las zonas bajas (414.000 Vs 262.845, respectivamente). Algunos autores mencionan la importancia de analizar

esta variable, dado que algunos factores pueden asociarse con la altura (presencia de parásitos) y por lo tanto influenciar el resultado de células somáticas [14]. Así mismo se menciona que la ubicación de los hatos puede llegar a presentar un impacto significativo en el RCS en zonas tropicales o subtropicales, especialmente si se tienen vacas de origen genético *Bos taurus* [21].

El número total de patógenos aislados de las muestras de tanque, también influyó sobre los RCS, observándose menores valores en aquellas muestras que presentaron de 4-5 patógenos (268.844). Por encima de 6 patógenos los RCS se incrementaron entre 342.058 y 390.301. Es evidente observar una tendencia a incrementar los RCS en la medida que aumentan los patógenos en tanque. Lo anterior sugiere que cada patógeno ocasiona una respuesta diferente de células somáticas y ésta puede ser creciente. Algunos autores manifiestan que la respuesta en el RCS depende del tipo de patógeno que se encuentre en glándula mamaria, siendo mayor para microorganismos infecciosos [21]. Se afirma que los altos RCS en algunos estudios se atribuyeron en mayor grado a los agentes patógenos infecciosos *Staphylococcus aureus*, y *Staphylococcus agalactiae* y ratifican que la presencia de patógenos ambientales producen una menor estimulación de las células somáticas siendo variable su respuesta [22, 23]; sin embargo, se debe resaltar que en este estudio el 86% de las bacterias fueron de tipo ambiental y el 14% fueron patógenos infecciosos, siendo posible que muchas de las bacterias ambientales generen procesos infecciosos que estimulan altos RCS, ya que algunas bacterias ambientales pueden sobrevivir en glándula mamaria, ocasionando estados crónicos de inflamación, con la respectiva respuesta celular [6].

Por último, con la variable época, también se obtuvieron diferentes valores de RCS ($Pr < 0,05$). Las cuatro épocas presentan mayor recuento en las épocas con tendencia a mayor precipitación, ésta aunque atípica en el período de medición según registros históricos [8] afectó el RCS. Se reportan datos que coinciden con las tendencias manifestadas por otros autores que afirman que el clima y/o la época del año influyen directamente sobre la presencia de mastitis, manifestando que durante la época lluviosa existe una mayor proliferación y transmisión de patógenos, afectando el RCS en condiciones de trópico [20]. Un estudio realizado en varias zonas de Colombia, concluyó que los RCS variaron entre 586.000 y 676.000 células.mL⁻¹, en épocas de verano e invierno, sin hallar diferencias

estadísticas entre estas [24]. Por otra parte, se menciona que en estabulación durante el verano se incrementa el número de bacterias ambientales en camas o sitios donde mantienen las vacas debido a las altas temperatura y humedad, incidiendo en el RCS [25].

Los factores que afectan el RCS en leche de tanque como se encontró son altamente significativos, brinda un marco general de trabajo de prevención diferente a lo que sucede cuando se realiza el análisis individual en vaca, donde si hay inflamación es posible informar que la mastitis se refleja en altos recuentos de células somáticas afectando la producción de leche por las lesiones que ocasiona en el tejido glandular [5, 25]. Adicionalmente, la importancia la incidencia de las variables en el RCS permite calcular las pérdidas económicas dado que por el incremento de cada 100.000 células somáticas a partir de 200.000, se pierde alrededor del 5% de la producción de leche total del hato [26].

Métodos para determinación de RCS

Cuatro técnicas ofrecidas en el mercado para el análisis de células somáticas y su aplicabilidad en trabajos de campo se estudiaron teniendo en cuenta los principios analíticos que agrupan los métodos diagnósticos DCC y PCHECK, y EKOMS; mientras que FOSS comparte agrupación con ambos tipos de pruebas. Debe considerarse que una prueba planeada en la comparación rigurosa de los equipos no se realizó, ya que no era el objetivo del trabajo; se encontraron diferencias significativas entre los métodos ($Pr < 0,05$), en donde los RCS obtenidos con EKOMS fueron más bajos que los obtenidos con DCC y PCHECK (Cuadro 1). Ninguno de los tres métodos evaluados (DCC, PCHECK Y EKOMS) mostró diferencias con respecto al método referente (FOSS) con valores de RCS que estuvieron entre 276.758 y 385.922.

El análisis de correlación de Pearson se puede observar en el cuadro 2. En general se encontraron valores de relación altos y estadísticamente significativos ($Pr < 0,05$). Estos resultados demuestran, que las técnicas mostraron mediciones de RCS con comportamientos similares en cuanto a dirección y magnitud. No obstante, la correlación de Pearson por sí sola no es suficiente para demostrar el grado de concordancia entre dos técnicas dado a que este parámetro mide la relación lineal entre 2 variables y esto se logra cuando los datos de las variables se encuentran a lo largo de una línea recta y no exactamente sobre

Cuadro 2. Correlación de Pearson entre cuatro métodos para la determinación de células somáticas.

	DCC	EKOMS	FOSS	PCHECK
DCC	1,0	0,645 <0,0001	0,853 <0,0001	0,686 <0,0001
EKOMS		1,0	0,770 <0,0001	0,738 <0,0001
FOSS			1,0	0,825 <0,0001
PCHECK				1,0

ella, que es lo que se requeriría para evaluar el grado de semejanza entre los métodos [11].

En la figura 1, se presenta el análisis de concordancia entre los tres métodos analizados (DCC, PCHECK y EKOMS) y la técnica referente (FOSS). En general, se puede observar que las mediciones de RCS obtenidas con DCC, PCHECK y EKOMS son comparables a las de la técnica FOSS. Para los tres casos el sesgo estimado en escala logarítmica encontrado fue: DCC y FOSS con media y desviación estándar (DS) $0,073 \pm 0,19$, y límites de concordancia (95%) entre -0,3 y 0,44; EKOMS y FOSS, media y (DS) $-0,075 \pm 0,222$ y límites entre -0,51 y 0,36; PCHECK y FOSS, media y (DS) $0,014 \pm 0,201$, límites entre -0,38 y 0,41. En general, la mayoría de las observaciones se encuentran centradas alrededor de cero y una variación con tendencia a ser constante. Este comportamiento fue más notable con la técnica DCC, seguida de PCHECK y EKOMS.

La baja magnitud de los sesgos estimados, en conjunto con desviaciones cercanas a cero, sugieren que los métodos DCC, PCHECK y EKOMS producen resultados similares a los de la técnica FOSS [11]. Lo anterior se confirma con las bajas correlaciones entre las diferencias y el promedio de cada observación que presentaron valores de -0,11, -0,13 y -0,21 para DCC, PCHECK y EKOMS, respectivamente, indicando que las varianzas de los métodos comparados son similares, y por lo tanto, que existe una alta concordancia entre cada una de las técnicas y el método referente [10]

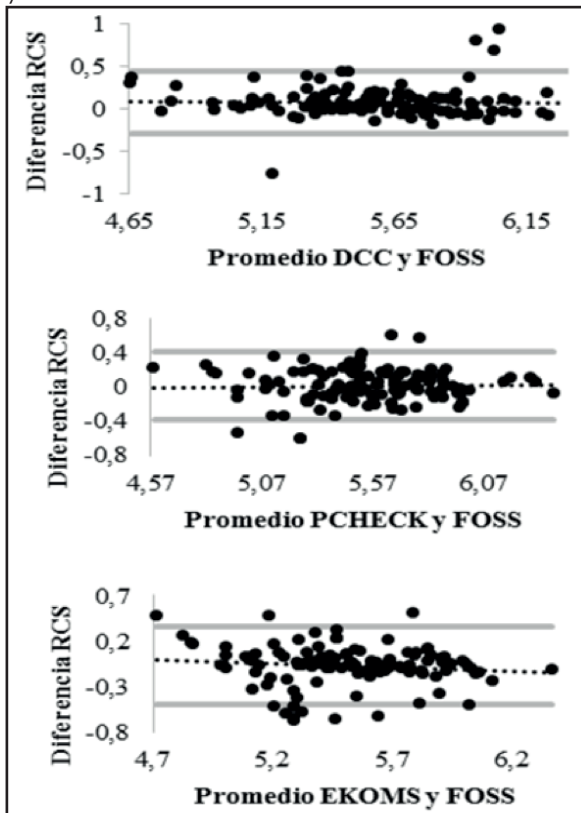
Con el objetivo de predecir las estimaciones de RCS de la técnica referente FOSS a partir de valores obtenidos por los métodos DCC, PCHECK y EKOMS, se realizaron regresiones inversas que generaron las siguientes ecuaciones: $FOSS = (DCC - 0,94)/0,84$; $FOSS = (EKOMS - 1,54)/0,71$ y $FOSS = (PCHECK - 0,93)/0,83$. La figura 2, presenta la relación entre los valores de FOSS reales y aquellos predichos por las

ecuaciones de regresión desarrolladas para cada uno de los métodos analíticos en estudio. Los resultados demuestran que basados en las estimaciones de las técnicas DCC, PCHECK y EKOMS se pueden obtener estimaciones lo suficientemente cercanas a los valores reales encontrados con la técnica FOSS. De esta manera, los valores de los métodos analíticos en estudio podrían ser usados para una determinación más precisa de los RCS, lo que brinda grandes ventajas, ya que algunas de estas técnicas son rápidas y flexibles para el análisis en campo.

Los resultados del análisis realizado para evaluar la capacidad discriminativa de los métodos en prueba (DCC, EKOMS y PCHECK) para identificar altos y bajos RCS similar a lo obtenido por el método referente (FOSS), a través de los análisis de la curva ROC se muestra en la figura 3 y cuadro 3.

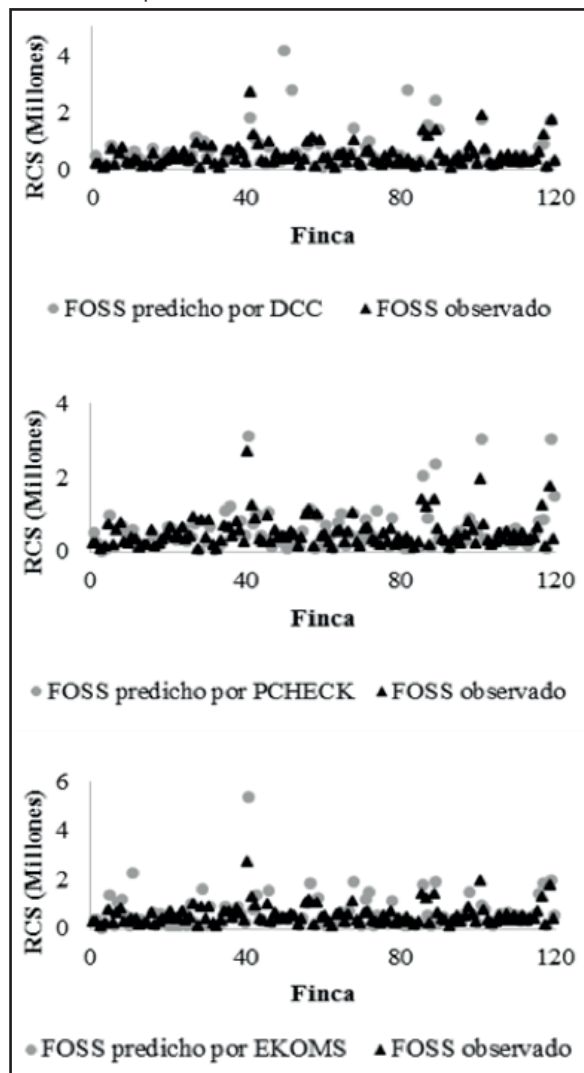
En general, la capacidad discriminativa fue alta para los métodos analizados, dado a que se encontraron valores de área bajo la curva por encima del 80% [12].

Figura 1. Análisis de concordancia entre FOSS (prueba referente) y tres métodos diferentes de RCS.



No obstante, es de resaltar que la técnica DCC presentó la mayor capacidad para discriminar entre altos y bajos RCS, mientras que EKOMS y PCHECK se comportaron de manera similar. Estos resultados muestran el mismo comportamiento encontrado en los análisis de concordancia. Los puntos de corte en escala logarítmica donde se alcanzó la mayor sensibilidad (probabilidad de tener altos RCS tanto con el método estándar como en el de prueba) y especificidad (probabilidad de tener bajos RCS tanto con el método estándar como en el de prueba) fueron de 5,63, 5,49 y 5,48 para DCC, PCHECK y EKOMS, respectivamente, valores que fueron muy cercanos

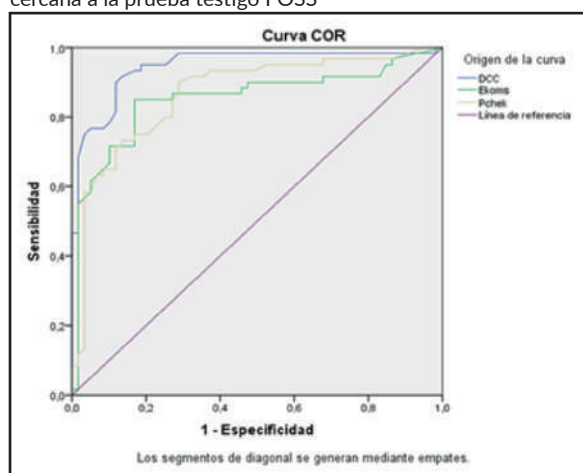
Figura 2. Relación entre los RCS reales obtenidos con FOSS y los predichos por las ecuaciones asociadas a los métodos analíticos comparados.



Cuadro 3. Parámetros estimados a partir de la Curva ROC, para cada uno de los métodos en estudio.

Parámetro	DCC	EKOMS	PCHECK
Área bajo la curva +/- EE	0,946 +/- 0,021	0,852 +/- 0,038	0,866 +/- 0,035
Límites de confianza 95%	0,904 - 0,988	0,777 - 0,926	0,798 - 0,934
Índice de Youden	0,78	0,68	0,61
Valor RCS (log)	5,63	5,48	5,49
Sensibilidad	0,90	0,85	0,90
Especificidad	0,88	0,83	0,71

Figura 3. Resultado de la prueba ROC, con sensibilidad más cercana a la prueba testigo FOSS



al punto de corte utilizado con la técnica referente FOSS para categorizar la variable RCS (5,55). De esta manera se lograron establecer valores de sensibilidad por encima del 85% y de especificidad por encima del 71%, reafirmando la capacidad discriminativa de los métodos en estudio.

CONCLUSIONES

El estudio presenta la incidencia de variables ambientales que afectan el RCS, en leche de tanque, estas fueron: época de muestreo, tipo de ordeño, zona (altitud), BPG, origen racial y alimentación con pollinaza y efecto de la cantidad de patógenos aislados, corroborando el efecto multifactorial de los sistemas de producción de leche que influyen sobre los RCS.

Los análisis comparativos entre los métodos de estimación de RCS indicaron que los RCS obtenidos con

las técnicas DCC, EKOMS y PCHECK son semejantes a los valores generados por el método referente FOSS.

REFERENCIAS

- [1] DALTON, K., ISRAELSEN, C. and YOUNG, A.J. The Importance of Increasing Milk Quality by Decreasing the Somatic Cell Count (SCC) [online]. 2017. Disponible en: https://digitalcommons.usu.edu/extension_curall/. [citado 15 de noviembre de 2017]
- [2] DAMM, M. *et al.* Differential somatic cell count—A novel method for routine mastitis screening in the frame of Dairy Herd Improvement testing programs. *Journal of Dairy Science*, 100(6), 2017, p. 4926-4940, DOI: 10.3168/jds.2016-12409.
- [3] IRAGUHA, B. *et al.* Comparison of cow-side diagnostic tests for subclinical mastitis of dairy cows in Musanze district, Rwanda. *Journal of the South African Veterinary Association*, 88(1), 2017, p. 1-6. DOI: 10.4102/jsava.v88i0.1464.
- [4] ALHUSSIEN, M. *et al.* Incidence of mastitis and activity of milk neutrophils in Tharparkar cows reared under semi-arid conditions. *Tropical animal Health and Production*, 48(6), 2016, p. 1291-1295, DOI: 10.1007/s11250-016-1068-8.
- [5] SIQUEIRA, .A.C. Avaliação dos resultados das contagens de células somáticas obtidas pelo equipamento ekomilk scan® e suas correlações com outros métodos de análise [Tese Médica Veterinária]. Sao Paulo (Brasil): Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2014, 35 p.
- [6] RUEGG, P.L. A 100-Year Review: Mastitis detection, management, and prevention. *Journal of Dairy Science*, 100(12), 2017, p. 10381-10397, DOI: 10.3168/jds.2017-13023.
- [7] CERÓN, M.F. *et al.* Buenas prácticas ganaderas: Caracterización de sistemas de producción bovina de leche en el Norte Antioqueño y su relación con calidad higiénica y sanitaria de la leche cruda. *Livestock Research for Rural Development*, 27(11), 2015.
- [8] COLOMBIA. CENTRO DE INVESTIGACIONES DE LA CAÑA (CENICAÑA). Base de datos de estaciones de meteorología en el Valle del Cauca. Datos publicados en página web de Cenicaña: Centro de Investigaciones de la Caña de Azúcar de Colombia [online]. 2015. Disponible en: www.cenicana.org/clima/index.php. [citado 5 mayo de 2017]

- [9] ZAJAC, P. *et al.* Fluorescence microscopy methods for the determination of somatic cell count in raw cow's milk. *Veterinari Medicine*, 61(11), 2016, p. 612-622, DOI: 10.17221/222/2015-VETMED
- [10] BLAND, J.M and ALTMAN, G. Comparing methods of measurement: why plotting difference against standard method is misleading. *The Lancet*, 6(8982),1995, p. 1085-1087, DOI:10.1016/S0140-6736(95) 91748-9.
- [11] DALLAL, G.E. Comparing Two Measurement Devices. Jean Mayer USDA Human Nutrition Research Center on Aging University, Boston, USA [online]. 2000. Disponible en: www.jerrydallal.com/lhsp/LHSP.HTM. [Citado 15 de diciembre de 2017].
- [12] CERDA, J. and CIFUENTES, L. Uso de curvas ROC en investigación clínica: Aspectos teórico-prácticos. *Revista chilena de infectología*,29(2), 2012, p.138-141. DOI Org/10.4067/S0716-10182012000200003.
- [13] FEDERACIÓN COLOMBIANA DE GANADEROS (FEDEGAN). Producción Colombia Inventario Bovino Nacional. Consumo. Bogotá D.C. Colombia [online]. 2016. Disponible en <http://www.fedegan.org.co/estadisticas/produccion-0>. [citado 26 octubre de 2017]
- [14] MORA, M.G. *et al.* Factores de riesgo para la incidencia de mastitis clínica en ganado lechero de Costa Rica. *Agronomía Costarricense*, 39(2), 2015, p. 77-89.
- [15] IZQUIERDO, A.C. *et al.* Production of milk and bovine mastitis. *Journal Advances Dairy Research*, 5(174), 2017, p.1-4, DOI: 10.4172/2329-888X.1000174.
- [16] RAMÍREZ, N. *et al.* Prevalencia de mastitis en vacas lecheras lactantes en el municipio de San Pedro de los Milagros, Antioquia. *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias*, 14(1), 2016, p. 76-87.
- [17] REYES, J. *et al.* Influence of milking method, disinfection and herd management practices on bulk tank milk somatic cell counts in tropical dairy herds in Colombia. *The Veterinary Journal*, 220, 2017, p. 34-39, DOI: 10.1016/j.tvjl.2016.12.011
- [18] KRISHNAMOORTHY, P. *et al.* Meta-analysis of prevalence of subclinical and clinical mastitis, major mastitis pathogens in dairy cattle in India. *International Journal Current Microbiology Applied Science*, 6, 2017, p. 1214-1234, DOI: 10.20546/ijcmas. 2017.603.141
- [19] CITALAN-CIFUENTES, L.H. *et al.* Análisis sensorial de leche de vacas suplementadas con un alimento fermentado a base de pollinaza. *Ecosistemas y recursos agropecuarios*, 3(8), 2016, p. 181-191.
- [20] MORA, M.G. *et al.* Effect of genetic and environmental factors on somatic cell count of dairy cattle from Costa Rica. *Agronomía Costarricense*, 40(2), 2016, p. 7-18.
- [21] EL-TARABANY, M.S., ROUSHDY, E.M. and EL-TARABANY, A.A. Production and health performance of Holstein, Brown Swiss and their crosses under subtropical environmental conditions. *Animal Production Science*, 57(6), 2017, p. 1137-1143, DOI 10.1071/AN15809
- [22] DAMM, M. *et al.* Differential somatic cell count -A novel method for routine mastitis screening in the frame of Dairy Herd Improvement testing programs. *Journal of dairy science*, 100(6), 2017, p. 4926-4940, DOI 10.3168/jds.2016-12409
- [23] KUKHTYN, M.D. *et al.* Staphylococcal contamination of raw milk and handmade dairy products, which are realized at the markets of Ukraine. *Journal for Veterinary Medicine, Biotechnology and Biosafety*, 2017, 3(1), p. 12-16, UDC 619:614.31:637.1.075:579.861.2(477).
- [24] VÁSQUEZ, J.F., LOAIZA, T. y OLIVERA, M. Calidad higiénica y sanitaria de leche cruda acopiada en diferentes regiones colombianas. *Orinoquia*, 16(2), 2012, p. 13-23, DOI: 10.22579 /20112629.251
- [25] LAMBERTZ, C., SANKER, C. and GAULY, M. Climatic effects on milk production traits and somatic cell score in lactating Holstein-Friesian cows in different housing systems. *Journal of Dairy Science*, 97(1), 2014, p. 319-329, DOI: 10.3168/jds.2013-7217.
- [26] GUIMARÃES, J.L.B. *et al.* Estimate of the economic impact of mastitis: A case study in a Holstein dairy herd under tropical conditions. *Preventive Veterinary Medicine*, 142, 2017, p. 46-50. DOI: 10.1016/ j.prevetmed.2017.04.011