

OBTENCIÓN Y EVALUACIÓN DE UN DIAGNOSTICADOR QUÍMICO PARA LA DETERMINACIÓN DE LA MASTITIS

A. Escobar y P. Ponce

División de Ciencia Animal, Grupo CENLAC, Centro Nacional de Sanidad Agropecuaria (CENSA), Apartado 10, San José de las Lajas La Habana, Cuba. Correo electrónico: escobar@id.censa.edu.cu

RESUMEN: Se desarrolló un diagnosticador químico de la mastitis (CENMAST) que contiene un detergente aniónico, ramificado sintético a diferencia del reactivo de California comercial, que emplea un detergente aniónico lineal. El CENMAST presentó una sensibilidad y especificidad del 97,7% y 97,5% respectivamente, y una eficacia de 97,6%. La correlación entre el CMT comercial (California Mastitis Test) y el CENMAST fue de 99,5% y con respecto al CCS fue de 0,9264 ($p < 0,0001$).

(Palabras clave: CMT; mastitis; CENMAST)

OBTAINMENT AND EVALUATION OF A CHEMICAL DIAGNOSTIC MEDIUM FOR TESTING MASTITIS

ABSTRACT: A chemical diagnostic medium for testing the presence of Mastitis (CENMAST) was developed, containing a synthetic and anionic detergent. This product had a sensibility and a specificity of 97,7 % and 97,5 % respectively and an efficacy of 97,6%. The correlation between CMT commercial (California Mastitis Test) and CENMAST was about a 99,5% and in relation to somatic cell count (SCC), it was about a 0,9264 ($p < 0,0001$).

(Key words: CMT; mastitis; CENMAST)

INTRODUCCIÓN

La mastitis es una de las enfermedades más costosa en el ganado bovino y sus pérdidas son billonarias. En Estados Unidos, las pérdidas sobrepasan los dos billones por año con un promedio cercano a 180 USD/vaca/lactancia (9). Múltiples estudios confirman que esta enfermedad es la principal causa de pérdidas económicas en la lechería moderna (2, 3, 12).

Los estudios realizados en Cuba antes de 1990, indicaron pérdidas de 164 pesos/vacas/lactancia y una reducción del 13% en la producción de leche (5). En los últimos años la prevalencia de la enfermedad es superior al 35% establecido a partir del diagnóstico bacteriológico positivo (1).

Los diagnósticos químico (CMT) y bacteriológico de la mastitis, constituyen aspectos esenciales dentro del programa de Control de Mastitis (PCM) para evaluar la prevalencia e incidencia de esta enfermedad y dirigir la estrategia del control.

El diagnóstico químico se realiza con el reactivo comercial conocido como CMT, y su principio activo es el alquilarilsulfonato de sodio, detergente aniónico lineal (10). Fue objetivo de este trabajo evaluar un nuevo principio activo químico para el diagnóstico de la mastitis similar al reactivo de California comercial.

MATERIALES Y MÉTODOS

Desarrollo del producto similar al reactivo de California

Se empleó como materia prima un detergente aniónico, ramificado a partir del cual se prepararon 4 formulaciones a diferentes porcentajes 1, 2, 3 y 4% con el empleo del indicador Bromocresol púrpura al 0,01% y se ajustó el pH entre 7 y 7,4.

Evaluación del producto

Se comprobó la efectividad de las cuatro formulaciones con un panel de muestra de leche provenientes de vacas con diferentes niveles de afecta-

ción de mastitis (negativa, traza, una, dos y tres cruces) y se comparó con un reactivo comercial proveniente de Canadá (L'Original CMT No. 2998392 & 2035384).

A cada formulación y al producto comercial se les determinaron los indicadores de pH, conductividad, densidad y el principio activo; se escogió la formulación que más se asemejó al producto comercial.

El pH y la conductividad se midieron en un pH-metro y conductímetro de la firma comercial WTW.

La densidad se determinó por diferencia de pesada en picnómetros de 50 mL (11).

El porcentaje del principio activo de detergente aniónico se determinó por valoración con bromuro de cetiltrimetilamonio y el uso como indicador azul de metileno (6).

Consistencia entre producciones

Se produjeron 20 lotes de producto, cada uno de 20 L y se le determinaron los indicadores de conductividad, densidad y principio activo; se determinó la estabilidad del producto a través de la medición de su principio activo. El producto se conservó a temperatura ambiente en frasco plástico de 1L.

Validación del producto

Se determinaron los valores de mastitis subclínica al utilizar los dos reactivos: el comercial y el producto nuevo en más de 1000 muestras de leche cruda, de vacas, con distintos niveles de afectación de mastitis provenientes de 4 granjas lecheras con diferentes tipos de manejo y razas para obtener un amplio rango de variación en el conteo celular.

Conjuntamente con los análisis del CMT a cada muestra se le realizó el conteo de células somáticas (CCS) mediante el método de referencia de conteo directo(4).

Diseño estadístico

Todos los resultados fueron agrupados en una base de datos y los valores del conteo de células, fueron transformados en log. para su posterior análisis. Se procedió a utilizar un sistema no paramétrico (Pearson) para correlacionar los valores de CMT con el CCS, así como la correlación entre los dos valores de CMT.

Se elaboró una tabla de contingencia 2 x 2 (CMT vs CCS) para determinar la sensibilidad, especificidad y eficacia clínica del producto, con la consideración de las muestras negativas como negativas y los valores de traza, una, dos y tres cruces, como positiva.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la Tabla 1 se observa que la formulación del 2 y 3% se asemejan de forma integral en todos los indicadores al producto comercial. La formulación de 4%, a pesar de tener buena especificidad al momento de determinar diferentes grados de mastitis subclínica, los indicadores de conductividad y densidad son más elevados, lo que se asocia con el incremento de la solución de hidróxido de sodio para alcanzar el pH deseado. La formulación al 1 responde bien a los indicadores de pH, conductividad y densidad, pero no tiene sensibilidad para poder detectar la mastitis subclínica.

TABLA 1. Propiedades físico química y actividad biológica de las diferentes formulaciones./ *Physicochemical properties and biological activity of different formulations*

Indicador	Producto comercial	1%	2%	3%	4%
pH	7,2 - 7,3	7,13	7,15	7,23	7,24
Conductividad - mS/cm	3,45	4,7	3,25	3,7	5,8
Densidad g/mL	0,9977± 0.0005	1,0003±0,0010	0,9978±0,0003	0,9981±0,0003	1.0025±0.0007
Principio activo %	2,81	1,20	1,95	2,88	3,84
Actividad					
Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
Traza	Traza	Negativo	Traza	Traza	Traza
X	X	Negativo	X	X	X
XX	XX	Negativo	XX	XX	XX
XXX	XXX	Negativo	XXX	XXX	XXX

Martínez y Martínez (5) prepararon diferentes formulaciones de reactivo de California con el empleo de Dodecil Benceno Sulfonato a concentraciones de 2, 2,5 y 4,1% y alquilarilsulfonato de sodio al 3 y 10%, se obtienen los mejores resultados con el 3 y 4,1% para el Dodecil Benceno Sulfonato y el 3% con el alquilarilsulfato.

En nuestro caso los mejores resultados se encontraron con la formulación 3 (3%), sin embargo la formulación 4 (4%) no presentó interferencia con el ensayo y estos resultados coinciden con los de Schalm y Noorlander (10) en su trabajo original, que a partir de 2,5% hasta el 3% del principio activo, obtienen sus mejores resultados y no presenta interferencia en el ensayo cuando emplean el 5% del detergente aniónico.

A diferencia de los detergentes empleados por Martínez y Martínez (8) y por Schalm y Noorlander, (10) que son alquilarilsulfonatos o alquilsulfatos de sodio o potasio, indistintamente. En este estudio se empleó un detergente aniónico ramificado sintético de uso industrial. Los resultados obtenidos entre la formulación comercial y el producto nuevo, fueron similares, por tanto puede ser empleado para el diagnóstico

de la mastitis. Los mejores resultados se alcanzaron con la formulación 3 y se le denominó con el nombre de CENMAST.

En la Tabla 2 se muestran los resultados obtenidos de 20 lotes de producción, en lo que respecta a los indicadores de conductividad, densidad y principio activo.

Los indicadores de conductividad, densidad y principio activo pueden variar entre 2-5,0 mS/cm; 0,9797-1,0240 g/mL y 2,69-3,11% respectivamente. Si se compara los resultados obtenidos, por cada lote todos los valores están dentro de los límites establecidos mencionados anteriormente, lo que demuestra la consistencia entre lotes.

En la Figura 1 se muestran la estabilidad del producto en diferentes lotes, en ella se observa que el principio activo se encuentra entre los valores establecidos para este indicador, así se encontró que el producto es estable hasta un año.

La comparación de los valores obtenidos entre el CMT y el CCS arroja una sensibilidad y especificidad clínica del 97,7% y 97,5% respectivamente, para una

TABLA 2. Valores de conductividad densidad y principio activo de los lotes producido del reactivo CENMAST./ *Conductivity-density values and active principle of the produced lots of CENMAST reactive*

Lotes	Conductividad mS/cm	Densidad	Principio activo %
010597	4,15	0,9922±0,0014	No determinado
020797	3,00	1,0125±0,0020	2,85 – 95%
030797	4,80	No determinado	2,93 98%
041297	3,40	0,9999±0,0004	2,96 99%
051297	3,40	0,9962±0,0014	2,84 95%
060198	3,80	0,9991±0,0010	3,01 100%
070198	3,00	1,0210±0,0007	3,00 100%
080198	3,80	0,9996±0,0019	2,96 99%
090298	3,80	0,9993±0,0090	2,96 99%
100398	3,00	1,0012±0,0003	2,83 94%
110398	3,30	0,9997±0,0005	2,77 92%
120498	2,40	1,0090±0,0020	2,84 95%
130498	3,10	0,9988±0,0016	2,86 95%
140598	3,70	0,9997±0,0013	2,89 96%
150598	3,80	0,9985±0,0009	2,83 94%
160698	3,4	0,9984±0,0045	2,86 95%
170698	4,6	0,9994±0,0003	2,87 96%
180998	3,0	0,9986±0,0014	2,96 99%
190998	2,3	0,9987±0,0003	2,92 97%
200998	3,3	0,9997± 0,00002	2,90 97%

eficacia del 97,6% (Tabla 3). Se empleó la clasificación hecha por Philpot y Nickerson (9) para relacionar el CMT vs CCS, donde la muestra negativa se estima hasta un valor de 250 000 cel/mL, por encima de este alcance se considera positiva (trazas, x, xx y xxx).

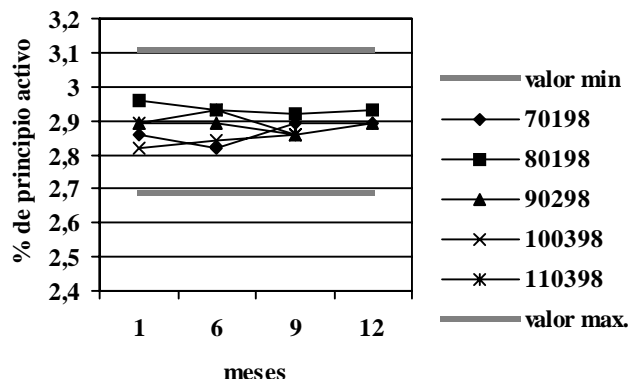


FIGURA 1. Estudio de estabilidad de diferentes lotes con respecto al principio activo/ *Stability study of different lots taking into account the active principle.*

TABLA 3. Resultado del análisis de contingencia entre CMT y CCS./ *Results of the contingency analysis between CMT and SCC*

		CCS			
C E N M A S T	C	+	665	10	675
	M				
	T	-	16	385	401
	Total		681	395	1076

Sensibilidad VP/(FN+VP) = 97,7%
 Especificidad VN/(FP+VN) = 97,5%
 Eficacia VP+VN/(VP+VN+FN+FP) = 97,6%

La correlación entre CMT comercial y el CENMAST tuvo un 99,5% de coincidencia, y con respecto al conteo de células somáticas fue de 0,9264 con una $P < 0,0001$ ($n=1076$).

En la Figura 2 aparece la distribución de frecuencia por rango de CCS según la clasificación de CMT, realizado por Philpot y Nickerson (9) y Marshall *et al.* (7), donde se detectó el 96,7; 97,9; 88,7; 97,9 y 100 % de las muestras negativas, trazas, una, dos y tres cruces respectivamente. En el caso de la detección de una

cruz, se encontró el porcentaje de eficiencia más bajo, en el que existió una sobreestimación hacia dos cruces y al estar el CCS entre $1,5 \times 10^6$ y 2×10^6 .

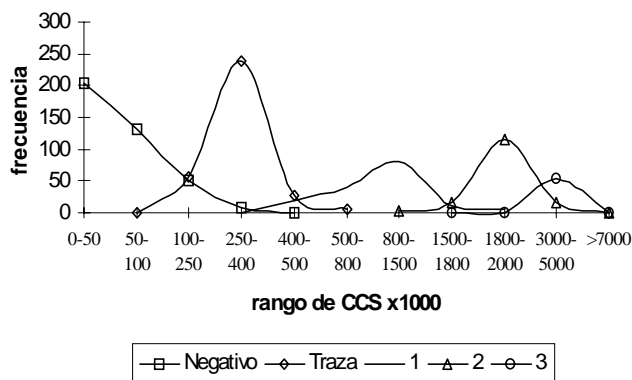


FIGURA 2. Distribución de frecuencia por rango de CCS según la clasificación de CMT./ *Distribution of the frequency per range of SCC according to the classification of CMT.*

En el estudio realizado en las diferentes granjas, se encontró que el 33,7% de las muestras analizadas tenían una o más de una cruz, mientras el 29,2 % presentaron trazas, estos resultados están acordes con los reportados en Cuba, donde existen una prevalencia del 35% establecido a partir del diagnóstico bacteriológico (1).

El porcentaje de cuartos afectados en el rebaño objeto de estudio fue del 63,4%, el 42 y 8% de los cuartos fueron positivos para dos y tres cruces respectivamente; estos valores corroboran lo planteado por Marshall y colaboradores, en el cual el porcentaje de muestra fuertemente positiva es del 25 al 40% en rebaños que el 60 o 75% de los cuartos se encuentran infectado (7).

Estos resultados corroboran que el reactivo CENMAST presenta la sensibilidad y especificidad adecuadas para la detección de la mastitis subclínica, en sus diferentes grados, quien es un diagnosticador químico efectivo similar al producto comercial.

REFERENCIAS

- Armentero, Mabelin (1998): *Evaluación de un desinfectante mamario post-orden de origen natural*. Tesis en opción al grado científico de Doctor en Ciencias Veterinaria. Universidad Agraria de la Habana. "Fructuoso Rodríguez Pérez"

2. Beck, H.; Sise, W. y Dood, F. (1992): Cost benefit of bovine mastitis in the UK. *J. Dairy Science* 59: 449-460.
3. Buragohain, J. y Dulta, G.N. (1994): A note on the efficacy of treatment during lactation for the control of bovine mastitis. *Indian Vet. J.* 71: 509-553.
4. FIL-IDF 148 (1991): Milk . *Enumeration of somatic cells* . Microscope method (reference method).
5. Fustes, E.; Avila, C. y Ortega, L. (1985): Mastitis bovina: efecto sobre la producción lechera y la economía agropecuaria en Cuba. *Rev. Salud Anim.* 7: 91-100.
6. INCOTEC (1986): NC 2123 *Industria Farmacéutica y de cosmético*. Tenso activos aniónicos alquil eter sulfatos y alquil sulfato para la fabricación de champu.
7. Marshall, R.T; J. E Edmondson y B. Steeven (1993): Using the California mastiti test. *Agricultural Publication* g3653.
8. Martínez, E. y Martínez, A. (1977): Estudio y control de test de California (CMT). *Rev. CENIC.* 8: 131-137.
9. Philpot, N. y Nickerson, S. (1992): Mastitis:*El contra ataque*. (Babson Bross Co. 1880 Country Farm Drive Naperville, IL 60563).
10. Schalm, W.O. y Noorlander, D.O. (1961): *Solution for testing for polymorphonuclear leukocytes*. Patente No 2989.392.
11. USP 23-NF18 (1995): U.S Pharmacopeia National Farmilary. *Specific gravity* (841) pg: 1830
12. Wilson, D.J.; González, R.N y Das, H.H. (1997): Bovine mastitis pathogens in New York and Pennsylvania prevalence and effect on somatic cell count and milk production. *J. Dairy Science* 80: 2592-2598.

(Recibido 1-6-99; Aceptado 12-11-99)