ANALISIS DE LA PREVALENCIA DE MASTITIS POR LA DETERMINACION DEL RECUENTO DE CELULAS SOMATICAS EN LA LECHE DEL ESTANQUE Y SUS RESPECTIVOS CULTIVOS BACTERIOLOGICOS

Carlos Concha Bascuñan, DVM
Departamento de Mastitis
Instituto Nacional de Medicina Veterinaria
750 07 Uppsala.Suecia.

RESUMEN

En el presente trabajo se hace análisis de la presencia de células y bacterias en la ubre de vaca. Se describen los métodos existentes para la evaluación de la mastitis mediante el estudio de las células somáticas desde la leche del estanque, considerando las bacterias contagiosas tanto como las ambientales que causan mastitis. También se consideran las otras bacterias que constituyen la flora de la leche, que estan muy ligadas al conepto de calidad de leche. Se hace una descripción de los parámetros de calidad usados por la industria lechera de los paises nórdicos.
Desde la leche del estanque también se puede determinar especificamente la presencia de las bacterias responsables de las mastitis en cada rebaño, mediante la toma de muestras para cultivos bacteriologicos; durante 4 días con 5 muestras diarias del estanque se aseguran una buena detección de los patógenos presentes en cada caso.
Se analiza también la metodología de vigencia epidemiológica de los rebaños mediante el diagnóstico de enfermedades usando los anticuerpos especificos presentes en la eche del estanque.

INTRODUCCION

La vigilancia de la mastitis de la vaca lechera no solo puede hacerse contando las células somáticas a nivel individual, por ejemplo, junto al control lechero mensual (determinación de grasa, proteína, producción de total de leche ,recuento de células somáticas,etc.) o al examen clínico de la ubre haciendo el «California Mastitis Test» (CMT), sino que también a nivel del rebaño, vigilando los recuentos de células somáticas en la leche del estanque de enfriamiento. Más aún, el trabajo de vigilancia en la leche del estanque es más simple, más barato, considera a los rebaños que no están asociados al Control Lechero y se puede realizar en conjunto con los examenes correspondientes al area de Calidad de Leche (recuento de bacterias totales, esporas, presencia de inhibidores etc.).
En el presente trabajo se hace un análisis de la presencia de células y bacterias en la ubre, así como también, la descripción de la metodología existente para la evaluación de la mastitis, nivel de calidad de leche y detección de otras emfermedades del rebaño en la leche del estanque de enfriamiento.

Las células somáticas o leucocitos presentes en la leche y su relación con la mastitis.

La mastitis continúa siendo la enfermedad más común y costosa que padece el ganado bovino lechero en todo el mundo.
Para prevenir y combatir las infecciones de la ubre, es determinante el conocimiento de sus mecanismos locales de defensa.
Las células somáticas o leucocitos, juegan un papel activo vital en la protección contra las infecciones de la ubre. Estas células se agrupan en tres diferentes poblaciones de leucocitos, que incluyen: leucocitos polimorfonucleares (LPMN), macrófagos y linfocitos, así como algunas células epiteliales y, en su conjunto, son designadas con un nombre muy difundido en todos los estudios de mastitis, recuento de células somáticas expresado en inglés como: «Somatic cell counts» (SCC). Existen muchos estudios sobre las cantidades totales de células y las proporciones de cada población presentes en la leche. Así, una ubre sana tiene durante la lactación normal una cantidad de células totales entre 50.000 y 200.000/ml de leche. Las poblaciones que forman las células somáticas aproximadamente son: 10% de linfocitos, 15% de LPMN, 73% de macrófagos y 2% de células epiteliales (provenientes del epitelio secretor). Si la salud de la ubre es alterada por una infección bacteriana, el número de células y las proporciones son claramente modificadas, pudiendo llegar a 10.000.000 de células totales/ml de leche con un 95% de células pertenecientes a la población de LPMN.

Esta transición, desde una ubre sana con bajos recuentos de células somáticas y secreción láctea normal, hasta una secreción anormal con alto recuento de células somáticas y grumos o escamas, tiene lugar en muy poco tiempo, solamente 2 horas (Persson et al., 1992).
El papel protector de los leucocitos en la ubre fué demostrado ya en 1968 por Jain et al. ; ellos produjeron leucopenia experimentalmente en vacas mediante inyección de suero anti-leucocitos. Cuando estos animales fueron después infectados con bacterias coliformes, estas bacterias se multiplicaron sin control en la ubre. En otro estudio similar en 1976, Schalm et al., consiguieron que ubres de animales infectados crónicamente con Staphylococcus aureus, mostraran una mastitis gangrenosa posterior a una leucopenia inducida por inyección de suero antileucocitos en esas vacas.
La mastitis es la inflamación de la glándula mamaria. Esta inflamación corrientemente ocurre en primer lugar por una infección bacteriana, pero también puede deberse a infecciones causadas por mycoplasmas, hongos o algas.
El propósito de la inflamación es doble: 1) eliminar o neutralizar los microorganismos invasores; y 2) ayudar a reparar los tejidos lesionados, para así, volver la glándula a su normal funcionamiento.
La infección ocurre cuando los microorganismos penetran el canal del pezón y se multiplican dentro de la ubre. Las infecciones pueden ser clínicas o subclínicas, dependiendo del grado de inflamación.
Las mastitis clínicas se caracterizan por sus anormalidades visibles en la ubre o en la leche. Ellas pueden ser sub-agudas, cuando los síntomas incluyen alteraciones menores o bien pueden ser mastitis agudas caracterizadas por la aparición repentina de inflamación, dolor y enrrojecimiento del órgano. Al mismo tiempo pueden presentarse síntomas generales, como fiebre y falta de apetito.
Las mastitis subclínicas son mucho más sutiles y no pueden ser diagnosticadas por inspección, pero pueden identificarse mediante pruebas que determinan la presencia de microorganismos infecciosos o de signos de la inflamación tales como el alza del número de células somáticas en la leche. Otro tipo corriente de mastitis es la forma crónica que puede comenzar de las formas clínicas o de las mastitis subclínicas, con signos intermitentes de ambos tipos de mastitis.
La determinación de las células somáticas se realiza actualmente con muestras tomadas directamente de la vaca mediante la ejecución del CMT, que se realiza por la mezcla de leche con un detergente (3% solución de Lauryl sulfato de sodio) que coagula el ADN de las células de la leche en una placa ad hoc. El resultado se evalúa de la manera siguiente:

Cuadro No 1

Grado (coagulación de leche + detergente)	Rango de los recuentos (células/ml)	Media de los recuentos (células/ml)
Negativo	<200 000	100 000
Trazas	150 000-500 000	300 000
1 Sospechoso	400 000-1 500 000	900 000
2 Positivo	800 000-5 000 000	2 700 000
3 Positivo	> 5 000 000	8 000 000

Para evaluar las células somáticas del estanque de enfriamiento también fue usado antiguamente el CMT, sin embargo, todos los especialistas en esta área coinciden en considerar el CMT como un método muy impreciso para la evaluación rutinaria del contenido celular de la leche en el estanque de enfriamiento. Los resultados del CMT de leche proveniente del estanque de enfriamiento, en su mayoría, quedan comprendidos en las categorías de «trazas» y «sospechosos». No obstante ello, en Suecia, por ejemplo, fue utilizado el CMT hasta 1975, fecha en que se introdujo el recuento electrónico de las células.
El recuento de células somáticas hoy dia, se realiza en distintas partes del mundo usando el principio «Fluoro-Opto-Electronic-Cell-Counting». En este método las células de la leche son teñidas con el colorante «fluorochrome» formando complejos específicos con el ADN del núcleo de la célula. Luego, las células son contadas por un microscopio fluorescente automático. Existen diferentes marcas de estas máquinas, siendo las más conocidas las de «FossElectric» de Dinamarca, o la Bentley de USA. Por ejemplo la serie 400 Fossomatic tiene una capacidad de recuento de 450 muestras de leche por hora, además de brindar la posibilidad de agregar un sistema que adicionalmente evalúa materia grasa, proteinas, urea y bacterias totales.
Para estos métodos, las muestras de leche de estanque o de animales individuales, deben ser preservadas durante su transporte al laboratorio con productos como bronopol.
La mayoría de los países productores tienen un control de células somáticas del estanque de leche con el propósito de tener una evaluación rutinaria del nivel de mastitis que es un factor muy importante en la calidad.
Los recuentos de células somáticas del estanque, generalmente reflejan la prevalencia de cuartos infectados en el rebaño lechero. Una relación importante existe también entre recuento de células somáticas, prevalencia de infección y pérdidas en la producción.

Cuadro No 2
Estimación de la prevalencia de la infección y pérdidas en producción asociadas con elevados recuentos de células somáticas (SCC). (NMC, 1996)

SCC/ml	% de cuartos de infectados en el rebaño	% de pérdidas en producción de leche
200 000	6	0
500 000	16	6
1 000 000	32	18
1 500 000	48	29

Las bacterias de la ubre y las mastitis.

La mastitis reduce la producción de leche de la ubre y altera la composición de ella. La magnitud de los cambios varían dependiendo de la severidad y duración de la infección. El microorganismo involucrado también es muy importante. La proporción de animales infectados en el rebaño es el principal factor que determina las pérdidas y las alteraciones en la composición de la leche del estanque. Las mastitis son mayoritariamente causadas por microorganismos, fundamentalmente bacterias.
En el cuadro No 3 se presentan las bacterias contagiosas y las del medio ambiente que causan mastitis.

Cuadro No 3
Bacterias contagiosas y ambientales que causan mastitis (NMC, 1996).

Bacterias contagiosas	Bacterias del medio ambiente
Staphylococcus aureus	Escherichia coli
Streptococcus agalactiae	Klebsiella species
Corynebacterium bovis (esta bacteria produce una muy benigna infección)	Citrobacterspecies
	Enterobacter species
	Streptococcus uberis
	Streptococcus dysgalactiae
	Streptococcus equinus
	Streptococcus canis
	Otras especies de estreptococos
	Enterococcus faecalis
	Enterococcus faecium

Existen otras bacterias que comúnmente habitan la ubre (cuadro No 4) y que generalmente sólo producen un leve nivel de irritación del órgano. Pero algunas de ellas pueden dar origen también a una verdadera mastitis. En este grupo se incluyen los estáfilococos diferentes del Staphylococcus aureus, corrientemente llamadas: estafilococos coagulasa negativa, con la abreviación inglesa CNS. Estas bacteria son de mucho interés puesto que ellas son las especies más prevalentes en la ubre de la mayoría de los rebaños cuando se realizan aislamientos.
Su presencia en la ubre causa un aumento leve pero significativo de las células somáticas en los recuentos, tanto del estanque como individuales.

Cuadro No 4
Staphylococcus sp. Estafilococos coagulasa negativa (NMC, 1996)
Staphylococcus chromogenes
Staphylococcus hyicus
Staphylococcus warneri
Staphylococcus epidermis
Staphylococcus simulans
Staphylococcus xylosus
Staphylococcus sciuri

De acuerdo con Pyörälä (1995),las mastitis causadas por CNS son comúnmente más leves desde el punto de vista clínico que las producidas por Staphylococcus aureus. En los países nórdicos, Staphylococcus hyicus, Staphylococcus simulans, Staphylococcus chromogenes y Staphylococcus epidermis son las especies más frecuentemente aisladas de casos de mastitis. En otros países la distribución puede ser diferente. Aunque no está bien estudiada la diferencia entre las especies en lo referente a su virulencia, sí está demostrado que la especie más virulenta es S. hyicus. La persistente presencia de CNS en el rebaño disminuye la producción de leche.
En el cuadro No 5 se enumeran los microorganismos patógenos menos comunes, pero también importantes productores de mastitis:

Cuadro No 5

Patógenos de mastitis menos comunes

Pseudomonas aeruginosa
Actinomyces pyogenes
Nocardia sp.
Mycoplasma bovis
Bacillus sp.
Hongos (Candida albicans)
Algas (Prototheca zopfii)

Bacterias de la ubre sana (Mantere-Alhonen, 1995).

La leche estéril fluyendo de la ubre puede contaminarse ya en el canal del pezón. Los contaminantes típicos incluyen micrococos, Corynebacterium sp., estreptococos, estáfilococos, Bacillus sp., enterobacterias y Pseudomonas sp. Durante la ordeña a máquina la leche está contínuamente en contacto con la piel de los pezones. Durante el pastoreo la piel de las vacas es menos contaminante que durante el período de estabulación.

Las superficies internas de los equipos de ordeño y de los estanques son muy extensas y pueden así juntar una enorme población de bacterias. Así precipitados del interior de los equipos pueden contener cantidades de bacterias de hasta 1011 de bacterias/ml. Con porcentajes de 6-20% de micrococos; 10-16%, corynebacterias; 0.8-30%, coliformes; 11-27% de otros Gram(-) y 0.5-3.6% aeróbicos formadores de esporas.

La calidad higiénica de la leche se evalúa mediante el recuento del total de bacterias por ml de leche. Un elevado recuento de bacterias totales se debe corrientemente a fallas en la limpieza de los equipos de ordeña o estanque de enfriamiento; también puede deberse a un mal funcionamiento de refrigerador del estanque. Cuando la leche está almacenada a +4 grados, los recuentos totales de bacterias no se incrementan durante las primeras 48 hrs.

El uso de la leche del estanque para la vigilancia del nivel de mastitis y calidad de leche.

La vigilancia de la leche es una parte muy importante en cualquier programa de salud de la ubre, salud del rebaño y de incremento de la producción. Tres aspectos pueden ser controlados en la leche del estanque: 1) Análisis de calidad de la leche 2) Determinación del nivel de mastitis y3) Detección de rebaños positivos a otras enfermedades de importancia en la producción.

Análisis de la calidad de la leche. En los países nórdicos y en general en Europa se acostumbra tomar al menos 4 muestras al azar del estanque de enfriamiento de la leche, para entregar un resultado mensualmente al productor, promedio de esas 4 muestras. Toda la leche del rebaño se protege en el estanque de frío desde donde es bombeada a camiones cisterna de la empresa lactea correspondiente.

El estanque enfría la leche hasta un máximo de +4 grados dentro de un período de 3 horas, desde el término de la ordeña.

El análisis de la calidad de la leche básicamente contempla las siguientes determinaciones:

1) Cantidad de bacterias, **2)** Cantidad de esporas, **3)** Sabor y olor, **4)** Células somáticas, **5)** Presencia de inhibidores, **6)** Punto de congelación.

1) Cantida de bacterias. La mala higiene del local y/o máquinas, así como altas tasas de mastitis hacen que la cantidad de bacterias se eleve enormemente. El total aceptable de bacterias es 1000-100 000 por ml. Si existen más de 100.000 bacterias/ml aumentan los riesgos de daño en los diferentes componentes de la leche. Estos cambios en los componentes hacen que la capacidad de conservación de la leche disminuya significativamente y que procedimientos industriales de aprovechamiento sean inaplicables.

2) Cantidad de esporas: Algunas bacterias tienen la habilidad de transformarse en esporas capaces de resistir la pasteurización. Así, las esporas de Clostridium sp. son muy dañinas para la producción de quesos y las de Bacillus sp., principalmente las de Bacillus cereus, para todos los productos lácteos. Las esporas pueden provenir de ensilajes en mal estado, quedando adheridas a los pezones. Si los pezones no son secados debidamente pasan las esporas a la leche. Actualmente los recuentos de esporas son también un importante elemento para la evaluación de las partidas de leche.

3) Sabor y olor: Estos factores son de vital importancia para la calidad de la leche. La admisión al estanque de leche del período de involución, leche mastítica, altas cantidades de ciertos grupos de bacterias, leche producto de ordeñamiento forzado, ciertos alimentos y olores del medio ambiente, pueden causar estas alteraciones. Personal especializado hace la evaluación de las partidas de leche en las plantas lecheras.

4) Células somáticas: Anteriormente se ha descrito el rol de las células en la defensa de la ubre. El parámetro cantidad decélulas somáticas en el estanque es el más difundido en todos los países productores de leche. Todos los países coinciden que los buenos recuentos deben ser <250 00 células somáticas/ml. Recuentos muy bajos tienen hoy todos los países nórdicos (Dinamarca: 250 000/ml; Suecia: 200 000/ml; Noruega: <150 000/ml; Finlandia <150 000/ml). La cifra máxima aceptable para la Unión Europea es de 400 000/ml.

5) Presencia de inhibidores: Mediante el análisis de substancias inhibidoras del crecimiento bacteriano se pueden detectar leches que tienen restos de medicamentos como antibióticos y desinfectantes que influyen en la flora normal de la leche e impiden el uso de ella en la fabricación de quesos, mantequilla y leche cultivada.

6) Punto de congelación. El punto normal de congelación de la leche varía entre -0.545 grados y -0.515 grados. Leches fuera de este rango son anormales con efectos negativos para la fabricación de productos lacteos. Los factores más corrientes que pueden producir esta variación son: aguado de la leche, leche en período de involución, leche que llegó a congelarse en el estanque, etc.

Cuadro No 6

Resumen de los parámetros del análisis de la calidad de leche (basado en la información de la industria lechera sueca, Aria, 1995)

Análisis	Cantidad de análisis	Clase 1	Clase 2	Clase 3
Bacterias totales	2 por mes a 300 000/ml	>100 000 /ml	101 000 /ml	<301 000 /ml
Esporas	6 por año	baja cantidad	alta cantidad	alta cantidad
Sabor y olor	1 por mes	sin problema	tendencia	tendencia
Células somáticas	promedio de dos controles por mes	-400 000/ml	401 000 700 000	<701 000
Inhibidores	1 por mes	sin problema	sin problema	indicios
Punto de congelación	6 por año	-0.545 a -0.515	-0.560 a -0.546	más bajo que -0.560

La industria lechera tiene sistemas de sanciones siguiendo la aplicación del cuadro No 6. Así, el productor por cada clase 2 tendrá una multa de 6 centavos de corona por kg durante ese mes de entrega de leche. Para el caso de clase 3 la multa será de 20 centavos por kg de leche.
La suspensión de la recepción de la leche se producirá cuando en un período de 60 días se tengan, por ejemplo 8 clases 2.

Determinación del nivel de mastitis (Philpot y Nickerson, 1992). Un procedimiento de análisis fué desarrollado en un laboratorio de Investigación de Mastitis de la Universidad del Estado de Louisiana ya en los años 60. El procedimiento ha sido ampliamente adoptado. Ofrece una información valiosa y rápida acerca de la salud de la ubre en general e higiene del rebaño en particular. El procedimiento implica tres pruebas: 1. El recuento de células somáticas; 2. Un recuento de bacterias (recuento normal de placa); y 3.Cultivo microbiológico en agar sangre para identificar cantidades de microorganismos específicos. La integración de la información obtenida de las tres pruebas le permite a una persona entrenada en los procedimientos: 1. Determinar el tipo, naturaleza, magnitud y causa probable del problema de mastitis en el rebaño; 2. Identificar un problema de higiene en el rebaño como evidencia de equipo mal lavado, ordeño húmedo o agua contaminada; 3. Mala refrigeración.
Es necesario que los tres componentes del análisis de la muestra del tanque se realicen. Cada componente ofrece valiosa información y le permite al especialista entrenado a ver el cuadro general del rebaño. La información ayuda a señalar la causa del problema así como a desarrollar las recomendaciones para la corrección del mismo.

Rebaño «A»

Recuento de células somáticas	155 000/ml
Recuento estándar de placa	1000
Cultivos en agar sangre Streptococcus	Muy pocos estafilococos, estreptococos y otros microorganismos. No hay Staphylococcus aureus o galactiae.
Interpretación	Excelente manejo del rebaño, bajo nivel de mastitis, buenas prácticas de ordeño y equipo limpio.

Rebaño «B»

Recuento de células somáticas	955 000/ml
Recuento estándar de placa	3000
Cultivos en agar sangre	25 colonias de Staphylococcus aureus y unas pocas de microorganismos misceláneos.
Interpretación	El conteo elevado de células somáticas probablemente es causado por un gran número de vacas infectadas por Staphylococcus aureus.

Rebaño «C»

Recuento de células somáticas	800 000/ml
Recuento estándar en placa	25 000
Cultivos en agar sangre	Grandes cantidades de colonias causadas por Streptococcus agalactiae.Pocas colonias de Staphylococcus aureus.
Interpretación	Un problema de mastitis en el rebaño causado por Streptococcus agalactiae. Unas pocas vacas infectadas con Staphylococcus aureus.

Rebaño «D»

Recuento de células somáticas	800 000/ml
Recuento estándar en placa	167 000
Cultivos en agar sangre	Muy grandes cantidades de Streptococcus agalactiae
Interpretación	Un problema de mastitis en el rebaño causado por Streptococcus agalactiae.

Rebaño «E»

Recuento de células somáticas	780 000/ml
Recuento estándar en placa	350 000
Cultivos en agar sangre	50 colonias de Staphylococcus aureus y grandes cantidades de estreptococos y otros misceláneos. Pocos coliformes y no hay Streptococcus agalactiae.
Interpretación	Existe un problema doble en el rebaño, una mastitis causada por Staphylococcus aureus y alto recuento bacteriano causado por mal lavado del equipo o problemas con el sistema de enfriamiento.

Rebaño «F»

Recuento de células somáticas	220 000/ml
Recuento estándar de placa	110 000
Cultivos en agar sangre	Muy grandes cantidades de coliformes
Interpretación	Pezoneras posiblemente rotas, o leche incubándose en las líneas del ordeño.

Rebaño «G»

Recuento de células somáticas	450 000/ml
Recuento estándar en placa	17 000
Cultivos en agar sangre	Una variedad de bacteria formadora de esporas ,estreptococos y Pseudomonas.

	Muy pocos Streptococcus agalactiae y Staphylococcus aureus están presentes.
Interpretación	La gran variedad de bacterias proceden tes del agua, indica que las ubres no están siendo secadas antes del ordeño. El rebaño tiene un problema pequeño de mastitis, causado por los dos últimos organismos y posiblemente por otros ambientales.

La metodología descrita anteriormente ,ha sido posteriormente modificada en diversas regiones de USA,de manera tal de mejorar su sensibilidad para la detección de los patógenos de mastitis.De acuerdo con Farnsworth(1993),la metodología actualmente contempla los aspectos siguientes:
1)Numero de muestras.La cantidad de muestras debe ser multiple y recolectadas durante varios días .Cinco muestras diarias durante 4 días han dado los mejores resultados.2)Método de muestreo.La leche debe estar perfectamente mezclada y la muestra tomada desde la parte superior del estanque.Muestras tomadas desde la llave inferior de salida del estanque no son recomendables ,allí se produce una incubación local de la leche.3) Siembra en placas.Además de sembrar en agar sangre,es recomendable hacerlo en medios diferenciales específicos,donde solo crecen estáfilococos,estreptococos y coliformes,respectivamente.El volumen de siembra debe ser ,por lo menos,0.2mL por placa.

Detección de rebaños positivos a otras enfermedades de importancia en la producción. En la leche del estanque se pueden detectar animales positivos a otras enfermedades del bovino. Esto es posible por la característica de la leche bovina de tener la inmunoglobulina IgG como la más predominante (Norcross, 1982).Mediante el uso de «Enzyme-linked Immunosorbent Assay» (ELISA) es posible detectar importantes enfermedades como,por ejemplo, Diarrea Viral Bovina (Niskanen et al. 1993) o Leucosis Bovina (Klintevall et al.1991). Un ELISA indirecto es capaz de determinar anticuerpos positivos del tipo IgG en la leche del estanque. Esta metodología se usa en toda Europa para la vigilancia epidemiológica de los rebaños lecheros.

SUMMARY

The work presented here analyses the presence of cells and micro-organisms in the udder of milk cow. Methods are described for the use of bulk tank milk to detect mastitis by determination of somatic cell counts and culture of bacteria .Primary mastitis pathogens are considered, as well as other mocroorganisms of the udder which are indicator of milk qyulity. A review is given of parameters which are used in the nordiccountries to determine milk quality in the dairy industry. Bulk tank milk can thus be used to determine the causal mastitis organisms on a herd basis: 5 samples taken over a period of 4 consecutive days will realiable detec the pathogens that are present. Bulk tank milk can also be used for epidemiological studies and the evaluation of control programmes directed to other pathogens by determination of specific antibodies to these organisms in milk.

REFERENCIAS

1) Arla,1995. Kvalitetsprogram för mjölkråvaran. Arla Mejeri.Stockholm.Sverige.

2) Farnsworth,J. 1993.Microbiologic examination of bulk tank milk. Veterinary Clinics of North America:Food Animal Practice,9(3),469-474.

3) Jain,N.C., Carrol E.I. and Schalm,O.W. 1968. Influence of antiserum to bovine leukocytes on circulating leukocytes of the cow.American Journal of Veterinary Research,29,2081-2087.

4) Klintevall, K.., Näslund, G., Svedlund, L., Hajdu, N., Linde, N., and Klingeborn, B. 1991.
Evaluation of indirect ELISA for detection of antibodies to bovine leukaemia virus in milk and serum. Journal of Virological Methods, 33 319-333.

5) Mantere-Alhonen,S. 1995.Microbiology of normal milk.In:The bovine udder and mastitis.Ed. M.Sandholm et al.,University of Helsinki .Faculty of Veterinary Medicine.

6) National Mastitis Council(NMC)1996.Current concepts of bovine mastitis.Madison.USA.

7) Niskanen,R. 1993.Relationship between the levels of antibodies to bovine viral diarrhoea virus in bulk tank milk and the prevalence of cows exposed to the virus.Veterinary Record,133,341-344.

8) Norcross,N.L. 1982.Secretion and composition of colostrum and milk.Journal of American Veterinary Medicine Association,181,1057-1060.

9) Persson,K..Hallen Sandgren,C. and Rodriguez-Martinez,H.Studies of endotoxin induced neutrophil migration in bovine teat tissues using indium III-labeled neutrophils and biopsies.American Journal of Veterinary Resarch ,53,2235-2245.

10) Philpot,W.N. and Nickersson,S.C.1992.Análisis de muestras del tanque.En:Mastitis:El contra ataque.Babson Bros.Co.Illinois 60563.USA.

11) Pyörälä, S. 1995. Mastitis caused by different microbes in: the bovine udder and mastitis. Ed. M. Sandholm et al., University of Helsinki, Faculty of Veterinary Medicine.

12) Schalm,D.W.,Lasmanis,J. and Jain,N.C.1976.Conversion of chronic staphylococcal mastitis to acute gangrenous mastitis after neutropenia in blood and bone marrow produced by an equine anti-bovine leukocyte serum.American Journal of Veterinary Research, 37,885-890.