

Use of the CMT and somatic cell counter[®] test to evaluate quality of cow milk in tank

Aplicación de la prueba de CMT y somatic cell counter[®] para evaluar calidad de leche de vaca en tanque

Bucio-Galindo, Adolfo^{1*}; Castañeda-Vázquez, Hugo²; Izquierdo-Reyes, Francisco¹

¹Colegio de Postgraduados, Campus Tabasco. km 3.5 Periférico Carlos A. Molina S/N, C.P. 86500, H. Cárdenas, Tabasco. México; ²Universidad de Guadalajara, Laboratorio de Mastitis y Diagnóstico Molecular, Depto. de Medicina Veterinaria.

*Autor de correspondencia: adbucio@colpos.mx

ABSTRACT

Objective: evaluate whether California mastitis test (CMT) values for bulk milk depend on its somatic cell content. Evaluate if the composition of the milk changes as a function of the number of somatic cells.

Design/methodology/approach: 48 samples of bulk milk from different dairy farms and cheese factories in Tabasco, Mexico were taken randomly. Measured parameters were: California Mastitis Test (CMT), the somatic cell count (CCS), fat, protein, non-fat solids, lactose. The values of CCS were grouped in 3 intervals: (<500,000), (>500,000-1,000,000), (>1,000,000) to be compared with qualitative data of CMT (0, 1, 2) in a two-way contingency table. Milk samples were also grouped in 4 categories according to their number of somatic cells A (0-250,000), B (>251,000-500,000), C (>500,000-750,000) y D (>750,000) to compare fat, protein, non-fat solids, lactose by one-way ANOVA and Tukey test at a 5% confidence level.

Results: the CMT values were dependent on its somatic cells content intervals; ($\chi^2=88.1$, $p<0.05$). A lower amount of non-fat solids, lactose and protein was observed in the group D, with highest category of somatic cells ($p\leq 0.05$).

Limitations on study/implications: the CMT test depend on the somatic cell content in cow's bulk milk. Milk with high somatic cell content had less non-fat solids, and less lactose.

Findings/conclusions: the CMT have been traditionally used to assess the udder's health of individual cows; in this research, we validate to use CMT to assess bulk milk samples. Samples with high somatic cell content had less non-fat solids, less lactose and less protein.

Keywords: California Mastitis test, somatic cells, bulk milk, health, cows.

RESUMEN

Objetivo: evaluar si los valores de prueba de mastitis de California (CMT) para la leche de tanque dependen de su conteo de células somáticas. Evaluar si la composición de la leche cambia en función del número de células somáticas.

Agroproductividad: Vol. 13, Núm. 4, abril. 2020. pp: 79-84.

Recibido: diciembre, 2019. **Aceptado:** marzo, 2020.

Diseño/metodología/aproximación: se tomaron al azar 48 muestras de leche de tanque de diferentes granjas lecheras y fábricas de queso en Tabasco, México. Los parámetros medidos fueron: Prueba de mastitis de California (CMT), conteo de células somáticas (CCS), grasas, proteínas, sólidos no grasos, lactosa. Los valores de CCS se agruparon en 3 intervalos: (<500,000), (>500,000-1,000,000), (>1,000,000) para compararlos con los datos cualitativos de CMT (0, 1, 2) en una tabla de contingencia de dos vías. Los valores de las muestras de leche también se agruparon en 4 categorías según su número de células somáticas A (0-250,000), B (>251,000-500,000), C (>500,000-750,000) y D (>750,000) para la comparación de contenido sólidos no grasos, lactosa, y proteína para ser analizados usando ANOVA con un factor; y la prueba de Tukey con un nivel de confianza del 5%.

Resultados: los valores de CMT dependen del contenido de células somáticas; ($\chi^2=88.1$, $p<0.01$). Se observó una menor cantidad de sólidos no grasos, lactosa y proteínas en el grupo de muestras de leche D, con mayor contenido de células somáticas ($p\leq 0.05$).

Limitaciones del estudio/implicaciones: la prueba de CMT depende del contenido de células somáticas en la leche de tanque. Las muestras con mayor número de células somáticas en la leche presentaron menor proporción de sólidos no-grasos, menor lactosa y menor proteína.

Hallazgos/conclusiones: la CMT se ha utilizado tradicionalmente para evaluar la leche de la ubre de las vacas individuales; en esta investigación, validamos el uso de CMT para evaluar muestras de leche de tanque. Eso es importante para los productores de queso porque el alto contenido de células somáticas está relacionado con menor contenido de sólidos no grasos y un menor rendimiento para queso.

Palabras clave: California Mastitis test, células somáticas, leche de tanque, salud, vacas.

et al., 2019). En caso de que haya una invasión muy fuerte de bacterias, el contenido de células somáticas de tipo inmunológico tipo leucocitos y células polimorfas nucleares aumenta como una respuesta a los microorganismos invasores. En el caso de la mastitis aguda los conteos pueden llegar hasta millones de células somáticas por mililitro (Castañeda Vazquez *et al.*, 2019).

El conteo de células somáticas (CCS) ha sido aceptado como el mejor índice cuantitativo de inflamación de la glándula mamaria bovina y se usa tanto para evaluar la calidad de la leche y para predecir la infección de la ubre. Existen varios métodos para hacer el CCS (Bedolla *et al.*, 2007), los más usados son el conteo de células somáticas por microscopía y el conteo electrónico de células somáticas como la citometría de flujo laminar (FOSS). La prueba de mastitis de California (CMT) es una estimación indirecta del CCS que se aplica en condiciones de campo. La CMT es una indicación cualitativa para saber si el recuento de células somáticas es elevado o bajo (Bedolla *et al.*, 2007). La prueba de CMT mide el grado de gelificación que tiene lugar cuando el ADN es liberado de las células somáticas presentes en la leche por la acción del reactivo; a mayor contenido celular en la leche, mayor gelificación y viscosidad (Serratos Arevalo *et al.*, 2019). Debido a que las células somáticas se producen como una reacción fisiológica en la vaca, es de esperarse que su contenido no puede aumentar en la leche una vez ordeñada; aunque si se esperaría autólisis después de periodos prolongados de almacenamiento. Así, la CMT se puede utilizar tanto para evaluar leche de muestra de cuartos mamarios, como una muestra

INTRODUCCIÓN

La mastitis es una inflamación de la glándula mamaria en el ganado lechero como consecuencia de la introducción y multiplicación de microorganismos patógenos. La mastitis bovina es uno de los grandes problemas de los productores de leche y de la industria lechera en general (Wolter *et al.*, 2004), y se asocia con pérdidas económicas debido a una disminución en la cantidad y calidad de la leche producida y los costos del uso de terapias (El-Sayed *et al.*, 2017). Un cuarto de la ubre sano es aquel que no muestra alguna alteración patológica externa, la leche no contiene microorganismos patógenos y tiene menos de 100,000 células somáticas por mL (Castañeda *et al.*, 2019). Las células somáticas no son parte de la secreción láctea y se encuentran presentes en la leche, algunas de ellas son células producidas por el sistema inmunológico, otras son células epiteliales que son producidas por descamación de los tejidos que dan recubrimientos a la ubre de la vaca y son diferentes de las bacterias (Blowey y Edmondson, 2010). En condiciones fisiológicas normales el conteo de células somáticas de la leche después del parto aumenta, y disminuye gradualmente a niveles basales mínimos entre cuatro y seis semanas después en vacas libres de infección intraglandular mamaria (Bedolla *et*

de leche del tanque enfriador (Bedolla et al., 2008). Sin embargo no hay datos que validen su uso para tanque enfriador o bote lechero. Debido a que es muy común que los productores de leche duden de que la prueba de CMT sea válida para evaluar la calidad de la leche de tanque, o bote lechero. Se evaluó si los valores de CMT para la leche de tanque dependen de su contenido de células somáticas, y además saber si la composición de la leche cambia en función del número de células somáticas.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se analizaron 48 muestras de leche de vaca cebuina y cruza en diversas proporciones recolectadas de diversos ranchos y queserías tomadas al azar en dos de las localidades más productoras de leche en Tabasco, México, que son Balancan y Huimanguillo de Julio a septiembre, entre 2016-2018. A las muestras se les hizo la prueba (CMT) y el conteo de células somáticas (CCS). La CMT se realizó utilizando un reactivo comercial (Mastitest). Se mezclaron 2 mL de leche con 2 mL de CMT reactivo. La interpretación fue calificada con cuatro puntajes: 0, reacción negativa; 1, positivo; 2, fuerte; 3, muy fuerte basados en la intensidad de formación de viscosidad y gelificación. El conteo de células somáticas (CCS) en leche se realizó utilizando el equipo DeLaval[®] Cell Counter (DDC), el cual cuenta las células ópticamente y de forma automática. La metodología empleada fue la indicada por el fabricante. El principio se basa en aspirar una pequeña cantidad de leche en un cassette que contienen un reactivo que emite fluorescencia cuando tiñe al ADN de las células con núcleo (células somáticas) presentes en la leche (Ortiz 2011), este cassette es introducido al DCC el cual cuenta con una cámara digital que toma una fotografía de las células que se tiñen, las cuenta y muestra los resultados expresados en CS/ μ l de leche en una pantalla en 45 s, en este caso se multiplicaron los datos por 1000 para tener los resultados en CCS/mL. El análisis de la composición nutricional de contenido de grasa, proteína cruda (PC), lactosa y sólidos no grasos (SNG), se realizó con el Milk Analyzer Lactoscan[®] (Milkotronic[®]) (Citalan Cifuentes et al., 2016).

Se elaboró una tabla de contingencia de dos vías (McClave y Sincich, 2017). Las dos vías fueron los intervalos de clase de células somáticas (columnas) y la calificación de CMT (renglones). Las columnas fueron (<500,000), (>500,000-1,000,000), (>1,000,000) y los renglones 0,1 y 2. Las cuarenta y ocho muestras tomadas aleatoriamente se contabilizaron en alguna de las celdillas de la

tabla de contingencia. La prueba χ^2 se hizo en el software Excel aplicando los procedimientos de tabla de contingencia de 2 vías (McClave y Sincich, 2017):

$$\chi^2 = \sum_{k=0}^n \frac{[n_{ij} - \hat{E}(n_{ij})]^2}{\hat{E}(n_{ij})}$$

$$\text{Donde } \hat{E}(n_{ij}) = \frac{r_i c_j}{n},$$

r , son los renglones, y c las columnas. El rechazo de la hipótesis de independencia se da con $\chi^2 > \chi_{\alpha}^2$, donde los valores críticos de $\chi_{0.05}^2$ tiene $(r-1)(c-1)$ grados de libertad.

Para determinar si la composición de la leche cambia en función del número de células somáticas, los conteos observados de n son muestras aleatorias de la población de interés, y por ello, los valores de las muestras de leche también se agruparon en cuatro categorías según su número de células somáticas A (0-250,000), B (>251,000-500,000), C (>500,000-750,000) y D (>750,000) para la comparación de contenido sólidos no grasos, lactosa, y proteína para ser analizados usando ANOVA con un factor; y la prueba de Tukey con un nivel de confianza del 5%. Los datos se analizaron con el Proc GLM ANOVA del SAS Versión 9.4, SAS Institute, Inc. Los datos de localidad no se reportaron pues no hubo muestras de las dos localidades en las dos categorías.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los valores de CMT y número de células somáticas de las muestras de leche de tanque se presentan en orden ascendente Figura 1. Los valores de células somáticas menores a 500 se asociaron con valores de CMT=0. Valores de células arriba de 500 células somáticas por mililitro se asociaron con valores de CMT de 1 y 2. Para análisis estadístico, de los datos cualitativos y cuantitativos, se hizo una tabla de contingencia de dos vías. En la Figura 2, se presentan una gráfica del análisis de frecuencias, en la que se observa claramente que las dos variables, calificación CMT y los intervalos de células somáticas son mutuamente dependientes; pues la χ^2 calculada=88.06 > $\chi_{0.05,4}^2$; >9.48. Considerando una explicación biológica, y una explicación de causa-efecto, las categorías de CMT dependen del rango de células somáticas presentes en la muestra. Así, CMT=0 cuando CCS está en los bajos intervalos. Algunas otras generalizaciones pueden ser que a mayor nivel de CCS mayor calificación CMT.

Las muestras de la clase <500,000 tiene 100% de muestras con categorías de CMT=0; las muestras de la clase 500,000-1000,000 tienen la mayor parte de las asignaciones a CMT=1 y solo 13.3% a CMT=0. Las muestras de leche de la clase >1,000,000 células somáticas, fueron 100% positivas a CMT=2. El rango de dispersión de los valores de células somáticas para cada categoría de CMT se muestra en la Figura 3, donde se observa que los tres grupos (CMT: 0,1,2) son estadísticamente diferentes en su número de células somáticas. Debe aclararse que no se puede hacer un análisis de correlación de Pearson entre los datos cuantitativos y cualitativos como son las células somáticas y CMT respectivamente.

La evaluación anteriormente presentada demuestra que la prueba CMT se puede utilizar para hacer una estimación del intervalo de células somáticas presentes en la leche y monitorear el estado sanitario de la leche de vacas en tanque directamente como una "prueba para centros de acopio de leche", o "prueba de leche para queserías". Muchas empresas no tienen los equipos, o los reactivos para las pruebas; y pueden usar la prueba CMT en complemento a otras pruebas como el Portachek, que se usa en algunos centros de acopio. Algunos autores han demostrado que la CMT, que se basa en la reacción química entre el reactivo y el ADN celular está bien correlacionado en

leche con conteo de células somáticas medidas con el FOSSOMATIC, tanto en términos de sensibilidad como de especificidad (Perrin et al., 1997). Así, se han diseñado sensores para estimación del recuento de células somáticas en línea basado en la formación de gel utilizando la prueba de CMT (Hogeveen, 2011).

Un número superior a 400,000 CCS indica mastitis subclínica (Wolter et al., 2004). De acuerdo a (Castañeda Vazquez et al., 2019) en los casos de mastitis subclínica hay una considerable reducción en la producción diaria de leche y cambios importantes en la composición de la leche. Se perjudica el valor higiénico de la leche, pues algunos agentes causales de mastitis son patógenos en humanos que afectarían los quesos con leche cruda; además puede haber residuos de antibióticos o químicos en la leche por el tratamiento de la ubre.

El pequeño productor de queso, o el acopiador de leche, usualmente no evalúa si las leches provienen de animales sanos, en lo que a mastitis se refiere. Es importante que los centros de acopio de leche; así como los procesadores de leche para queso evalúen el CCS de la leche que reciben, ya sea usando CMT u otros, pues números altos de células somáticas, reduce la aptitud de leche para procesarse. De acuerdo a Jaeggi, et al. (2003), a medida que aumenta el nivel de células somáticas, aumenta el tiempo requerido para cuajado de la leche. Los contenidos de grasa y humedad son más bajos en los quesos con mayor (CCS). Aumentan los niveles de ácidos grasos de cadena corta. Los niveles de ácidos butírico y caprílico son significativamente más altos en los quesos del grupo >1,000,000 Conteo de Células Somáticas (CCS) en todas las etapas de maduración; además

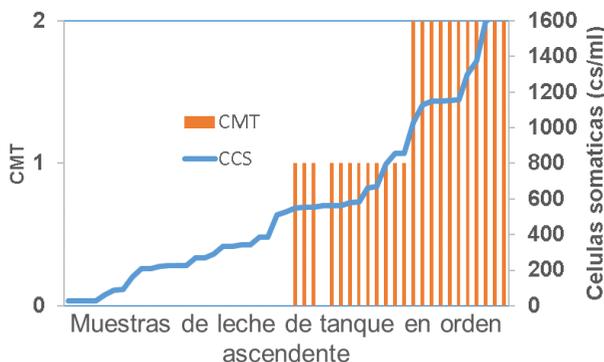


Figura 1. CMT y Células somáticas para cada muestra de leche de tanque ordenadas ascendentemente con base al número de células somáticas. La leche de tanque es colectada de varias vacas.

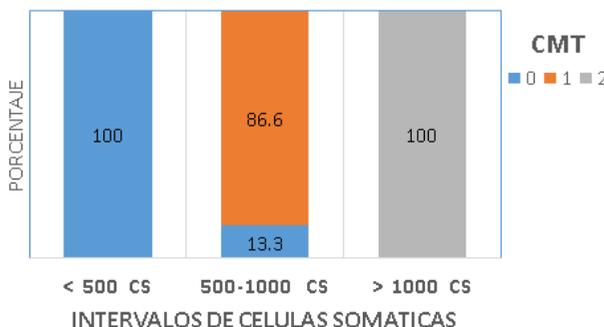


Figura 2. Gráfica de barras que muestra el porcentaje de valores CMT para cada intervalo de clase de las células somáticas en la leche de tanque.

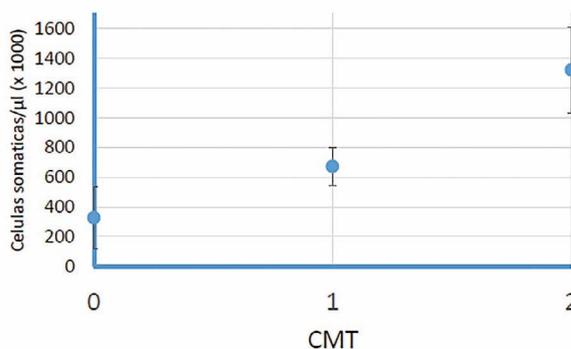


Figura 3. Conteo de Células somáticas (CCS) mostrando desviación estándar en relación a calificación CMT.

se asocian con un sabor rancio en los quesos con el nivel más alto de Conteo de Células Somáticas (CCS). Los quesos se maduran con cierto amargor, afectando la calidad sensorial de los productos y las ventas.

En relación a la composición nutrimental de la leche con diferentes niveles de células somáticas (Cuadro 1), se observó que no hubo variaciones en grasa entre los grupos ($p \geq 0.05$), pero si se observaron variaciones en otros componentes. En el grupo D, se redujeron los sólidos no grasos, la lactosa y la proteína. Esto reafirma lo que otros autores han encontrado en relación a que un recuento elevado de células somáticas, reduce el contenido de lactosa (entre 5-20%) y caseína (Le Maréchal et al., 2011). Mientras el nivel de proteína total permanece casi sin cambios, el nivel de caseína es disminuido hasta en 20%, pero las proteínas del suero aumentan especialmente en albúmina sérica y la inmunoglobulina G (Le Maréchal et al., 2011). La reducción de dichos componentes lácteos tiene impacto económico, pues para los fabricantes de queso, se reduce el rendimiento de la leche (Blowey y Edmondson, 2010). En varios estudios, un alto CCS se asocia con un aumento significativo en el tiempo de coagulación, menor firmeza en la cuajada y tasa más lenta de cuajada reafirmante, lo que puede conducir a bajo rendimiento y baja calidad del queso resultante (Le Maréchal et al., 2011).

El uso de la prueba de CMT a partir de leche de tanque permite tener una evidencia presuntiva para conocer si la leche proviene de hatos de animales sanos o no sanos (Bedolla et al., 2007). y genera información para el productor lechero, generar mayor supervisión al hato de vacas para detectar a los animales con mastitis subclínica o clínica para excluirlos de la ordeña. Es necesario enseñar a los productores lecheros en pequeño como hacer la prueba de CMT.

CONCLUSIONES

La prueba CMT se puede utilizar como una medida del contenido de células somáticas en la leche de tanque de

vaca. El alto contenido de células somáticas está relacionado con un menor contenido de sólidos no grasos, menos lactosa y menos proteína.

AGRADECIMIENTOS

Se agradece a fondos de las Microrregiones de atención prioritaria (MAP-Tabasco) del CP por financiamiento de reactivos; también se agradece a "Quesos poros genuinos de Balancan, SPR de RL" por haber financiado la compra de los equipos de análisis de leche y contador de células somáticas Delaval Cell Counter. Agradecimiento a los organizadores de la cátedra Jean Monet de la Unión Europea "Higiene y bienestar animal: medidas preventivas de la salud del hato" 2018 por haber financiado la presentación de la primera versión de este manuscrito en el CUCBA, de la Universidad de Guadalajara.

LITERATURA CITADA

- Bedolla Cedeño, C., Velázquez Ordoñez, V., Valladares Carranza, B., Cordova Izquierdo, A., Saltijeral Oaxaca, J., Castañeda Vázquez, H., Castañeda Vázquez, M.A., & Wolter Wilfred (2019). Factores de Riesgo asociados en la mastitis de las vacas. En: La mastitis bovina, Editores Castañeda Vázquez, H. Wilfried Wolter, Martha Alicia Castañeda Vázquez. ISBN 9 786078 490752
- Bedolla, C. C., Castañeda, V. H., & Wolter, W. (2007). Métodos de detección de la mastitis bovina (Methods of detection of the bovine mastitis). Redvet. <http://www.veterinaria.org/revistas/redvet/n090907/090702.pdf>
- Blowey, R. W., & Edmondson, P. (2010). Mastitis control in dairy herds. Cabi.2nd ed
- Castañeda Vázquez, H., Castañeda Vázquez, M. A., Wolter, W., Padilla, Ramirez, F. J., Bedolla Cedeño C., & Salas Castañeda, E.P.(2019). La producción sustentable de leche. En: La mastitis bovina, Editores Castañeda Vázquez, H. Wilfried Wolter, Martha Alicia Castañeda Vázquez. ISBN 9 786078 490752
- Castañeda Vázquez, H., Castañeda Vázquez, Serratos Arevalo, J. C., Wolter, W., Padilla, Ramirez, F. J., & Salas Castañeda, E.P. (2019). Mecanismos de defensa de la ubre. En: La mastitis bovina, Editores Castañeda Vázquez, H. Wilfried Wolter, Martha Alicia Castañeda Vázquez. ISBN 9 786078 490752
- Citalan Cifuentes, L. H., Ramos Juárez, J. A., Salinas Hernández, R., Bucio Galindo, A., Osorio Arce, M. M., Herrera Haro, J. G., & Orantes Zebadua, M. A. (2016). Análisis sensorial de leche de vacas suplementadas con un alimento fermentado a base de pollinaza. Ecosistemas y recursos agropecuarios, 3: 181-191. http://www.scielo.org.mx/scielo.php?pid=S2007-90282016000200181&script=sci_arttext&tlng=en

Cuadro 1. Contenido de grasa y otros nutrientes de leche con diferentes números de células somáticas.

Categoría de número de células somáticas	Numero de muestras	Grasa (%)	Sólidos no grasos (%)	Lactosa(%)	Proteína(%)
A (0-250)	14	3.16	8.26 A*	4.53 A	3.22 A
B (251-500)	9	3.50	8.29 A	4.54 A	3.25 A
C (501-750)	13	3.32	8.34 A	4.60 A	3.18 A
D (>751)	12	3.80	7.98 B	4.39 B	3.08 B

*Medias con letras diferentes son estadísticamente diferentes ($p \leq 0.05$).

- El-Sayed, A., Awad, W., Nadra-Elwgoud Abdou, & Castañeda Vázquez, H. (2017). Molecular biological tools applied for identification of mastitis causing pathogens. *International Journal of Veterinary Science and Medicine*. 5: 89-97. doi.org/10.1016/j.ijvsm.2017.08.002
- Hogeveen, H. (2011). Mastitis therapy and control-Automatic on-line detection of abnormal milk. In *Encyclopedia of Dairy Science* (Ed: Roginski, H., Fuquay, J. W., and Fox, P. F.). (pp. 422-428). Academic Press. *Encyclopedia of Dairy sciences*. Volumes 1-4. Academic press.
- Jaeggi, J. J., Govindasamy-Lucey, S., Berger, Y. M., Johnson, M. E., McKusick, B. C., Thomas, D. L., & Wendorff, W. L. (2003). Hard ewe's milk cheese manufactured from milk of three different groups of somatic cell counts. *Journal of Dairy Science*, 86: 3082-3089.
- Le Maréchal, C., Thiéry, R., Vautor, E., & Le Loir, Y. (2011). Mastitis impact on technological properties of milk and quality of milk products—a review. *Dairy Science and Technology*, 91: 247-282.
- McClave, J. T., y Sincich, T. (2017). *Statistics*. 13ed. Pearson, 330 Hudson Street, NY NY 10013.
- Ortiz Z., C, Concha U., A., & Cayro C., J. (2011). Recuento de células somáticas en leche contaminada con residuos de antibióticos. *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú*, 22(2), 151-154. Recuperado en 09 de febrero de 2020, de http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1609-91172011000200011&lng=es&tlng=es.
- Perrin, G. G., Mallereau, M. P., Lenfant, D., & Baudry, C. (1997). Relationships between California mastitis test (CMT) and somatic cell counts in dairy goats. *Small Ruminant Research*, 26: 167-170.
- Serratos Arevalo, J. C., Castañeda Vázquez H, Castañeda Vazquez M. A., Padilla Ramírez F.J., Salas Castañeda, E.P., Bedolla Cedeño C., Wolter W. 2019. Mastitis causada por Enterobacterias. En: *La mastitis bovina*, Editores Castañeda Vázquez, H. Wilfried Wolter, Martha Alicia Castañeda Vázquez. ISBN 9 786078 490752
- Wolter, W., Castañeda, H., Kloppert, B., & Zschöck, M. 2004. Mastitis bovina: prevención, diagnóstico y tratamiento. Editorial Universitaria. Guadalajara. No. Pp.19.

