

Diagnóstico de la mastitis bovina

Diagnosis of bovine mastitis

López Rodríguez Maria Jose¹, Ramos Cárdenas Albert Jesús¹,
Muñoz Molina Liliana Constanza, Msc²

Recibido: 21 de enero de 2021

Aceptado: 28 de junio de 2022

Resumen

La principal función de la glándula mamaria es la de generar leche con un alto contenido nutricional de proteínas y grasas. Cuando hay un proceso inflamatorio causado por mastitis, hay enormes efectos en la economía agrícola debido a la reducción de la producción, tratamiento del bovino, y gran dificultad en la clasificación de los diversos tipos de mastitis existentes. En Colombia, como en otros países, tradicionalmente, los métodos de detección han incluido la estimación de recuentos de células somáticas, identificación de los microorganismos que a menudo implica métodos de cultivo, medición de biomarcadores asociados con la aparición de la enfermedad y recientemente, avances importantes en la identificación de marcadores de ácido nucleico que son de importancia en el diagnóstico.

Palabras claves: bovino, mastitis, leche cruda, células somáticas.

1. Estudiantes de Bacteriología y Laboratorio Clínico. Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca.

2. Msc. Biología con énfasis en bioquímica y biología molecular. Docente de Microbiología y Bacteriología. Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca.

Correspondencia: lcmunoz@unicolmayor.edu.co

Abstract

The main function of the mammary gland is to produce milk with a high content of proteins and fat components. When there is an inflammatory process caused by mastitis, that greatly affects the agriculture business decreasing the production and treatment of bovines and making it very difficult to classify the variety of the known mastitis. In Colombia like in other countries, the traditional method of detecting mastitis includes estimating the somatic cells count, identifying microorganisms that usually include culture methods and biological markers associated with the presence of the illness, and recent important discoveries identifying nuclei acid markers which are very important in the diagnostic process.

Keywords: bovine, mastitis, raw milk, somatic cell count.

Introducción

La glándula mamaria bovina es un órgano dinámico y complejo, requiere una estructura única compuesta por varios tipos de células con la capacidad de síntesis y secreción de leche, considerada una fuente de alimento en humanos, por su alto contenido nutricional en forma de proteínas y grasas lácteas, la cual se obtiene mediante buenas prácticas de ordeño manual o mecánico implementadas en Colombia con el Decreto 616 del 2006 (1).

Para dar cumplimiento a la normatividad colombiana, se debe monitorear la salud del hato, mediante la adecuada higiene de la ubre la cual es susceptible a la mastitis clínica o subclínica debido a la colonización de

bacterias patógenas en el área externa del canal del pezón, cuyo efecto es la disminución en la calidad y en la producción de la leche, y a su vez asociada a pérdidas económicas. Avances tecnológicos y científicos han desarrollado muchas técnicas de diagnóstico para la mastitis, algunas se aplican en el campo como la prueba de CMT, y en el laboratorio mediante el conteo de células somáticas (CCS), análisis microbiológicos y bioquímicos (2).

Como todas las enfermedades, es importante comprender los mecanismos de diagnóstico oportuno y confiables establecidos, para detectar las posibles causas en el proceso inflamatorio originado por una respuesta inmune, que permitan buscar decisiones óptimas y oportunas para prevenir las infecciones en el hato, y

mejorar la calidad de la leche y el poder adquisitivo de los lecheros (3).

El objetivo de esta revisión es resumir las herramientas ampliamente disponibles para evaluar la salud de la ubre y la calidad de la leche, a partir del diagnóstico oportuno y la creación de estrategias de tratamiento y control en las fincas para disminuir la enfermedad y sus consecuencias (4).

Estructura de la glándula mamaria bovina: mamogénesis, lactogénesis, galactopoyesis e involución

El desarrollo de la glándula mamaria inicia en la fase fetal temprana, mediante una diferenciación celular o mamogénesis, proceso proliferativo que involucra interacciones de células de origen mesodérmico con alto contenido de tejido adiposo, para formar la línea mamaria y el botón mamario, que se convertirá posteriormente en la yema mamaria tras la diferenciación de las células epiteliales por medio de señales inductivas de la mesénquima. Las células de la yema mamaria se expanden esféricamente y finalmente se forma un tallo que se conecta con la epidermis, rodeando el epitelio donde se encuentra una capa delgada de fibroblastos cubierta por tres o cuatro capas de tejido conectivo y fibroso rico en colágeno (5).

Un cordón sólido de células epiteliales se extiende desde la yema mamaria y crece a través de este tejido conectivo hacia el tejido graso, luego inicia la ramificación dicotómica formando un sistema ductal rudimentario de 10 a 15 ramas, dando origen a la organización y estructura de la glándula mamaria. El ducto mayor da lugar a la cisterna que contiene una invaginación para dar origen al pezón; el músculo del esfínter del pezón representa la primera línea de defensa innata, y favorece el cierre del canal, mientras que el epitelio queratinizado de la cisterna del pezón es considerado la segunda línea de defensa (6).

Estas estructuras continúan creciendo durante el nacimiento y la pubertad, la presencia de estrógenos favorece el crecimiento del ovario y del peso corporal. Por otra parte, en el desarrollo post puberal se produce la elongación y ramificación del sistema de ductos, y durante el embarazo ocurre la maduración del lóbulo alveolar, para posteriormente formar las glándulas anteriores y posteriores, que favorecen la producción de la leche. Pocos días después se observa una reducción de tejido adiposo y prolongación del epitelio ductal que da origen a la formación de los lóbulos alveolares. En el post parto, se continúa con un periodo de diferenciación denominado lactogénesis. Figura 1 (7).

En la involución, los eventos degenerativos de la glándula se correlacionan con la cesación de la lactancia mamaria. Dichos eventos tienen lugar durante la involución de la glándula después del cese de la lactancia, del destete o del final del ordeño (8).

La síntesis de proteínas de la leche durante el proceso de lactación involucra: polipéptido y hormonas esteroideas, así como interacciones con células del estroma y extracelulares. Adicionalmente, las proteínas de la matriz (ECM) controlan la diferenciación de las células mamarias (9).

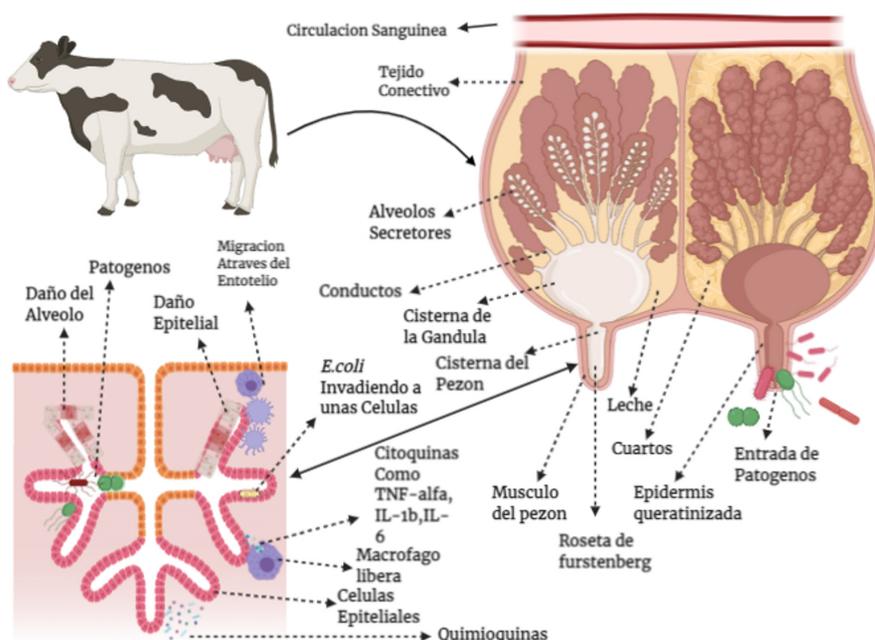


Figura 1. Estructura de la glándula mamaria bovina. Se evidencia los factores celulares y estructurales que participan en la respuesta inmune post infección (10).

Proceso Infeccioso de la Glándula Mamaria

La adherencia de bacterias en el interior de la glándula mamaria especialmente en el conducto del pezón y en la cisterna, en la etapa de lactancia, genera una respuesta inmunológica cuando los macrófagos ubicados en los alvéolos fagocitan las bacterias que han ingresado a la cisterna y produce liberación de citoquinas pro

inflamatorias como TNF-a, IL-1b e IL-6, estas a su vez, facilitan el reclutamiento de neutrófilos al sitio de la infección y las células situadas cerca del tejido conectivo, regulan la contractilidad del esfínter y, pueden actuar como un componente del sistema inmunológico innato de la glándula mamaria del rumiante demostrado por la positividad para CD117 y vimentina (11). Figura 1.

Cuando el sistema inmune no responde se inicia el proceso infeccioso e inflamatorio denominado mastitis que se clasifica de la siguiente manera:

- **Mastitis clínica:** se atribuye a cambios en los vasos sanguíneos debido al proceso inflamatorio y al daño de las células epiteliales que son responsables de la síntesis de leche y de cada uno de sus componentes. Los bovinos presentan anorexia, depresión, fiebre, y en los cuartos se observa inflamación, dolor, enrojecimiento de la ubre, en gran mayoría de las veces disminución del 50% en la producción de leche. Además de alteraciones físicas en la leche formando coágulos, grumos, que se asocian con la colonización bacteriana e infección en la glándula mamaria especialmente en los alvéolos (11).

- **Mastitis subclínica:** notoria en animales que tienen más de un ciclo de lactación, se caracteriza por no presentar signos visibles de infección. La leche cuando se extrae es aparentemente normal, pero con respecto a la producción se presenta una disminución del 40% (11).

Diagnóstico microbiológico de la mastitis:

En Colombia los Decretos 1500 de 2007 y 616 de 2006 (12), mediante las Resoluciones 2341 de 2007 y 3585 de 2008 (13) del Instituto colombiano agropecuario (ICA) y la Federación colombiana de ganaderos (FEDEGAN) respectivamente, orientan y reglamentan las buenas prácticas de ordeño, los procesos de higiene que deben tener los manipuladores antes y después de la recolección de la muestra para el análisis microbiológico tanto en campo como en el laboratorio para su procesamiento. Figura 2



Figura 2. Pruebas realizadas para diagnosticar la mastitis bovina. 1. Paleta requerida para la prueba de CMT. 2. Análisis microbiológico Recuento en placa y recuento por el número más probable.

Pruebas realizadas en el campo

Prueba de mastitis en campo de surf

Se realiza mediante una solución al 3% de un detergente líquido agregando 3 mL y 3 mL de la leche. Si hay mastitis se observa una leche con una textura espesa y poco concisa. En conclusión, cuando se comparan sus resultados de California mastitis test (CMT) la eficiencia es menor (14).

California Mastitis Test (CMT)

Esta prueba se inventó en 1957 por Schalm y Noorlander para la detección de mastitis subclínica y clínica. En esta

prueba se aplica el detergente Lauril Sulfato de sodio al 3% más un indicador de pH como el azul púrpura de bromocresol. Una vez adicionado esta solución se produce un rompimiento en las membranas citoplasmáticas y nucleares de los PMN, provocando la aglutinación del ADN extranuclear que se gelifica como una masa fibrosa y provocando la precipitación de la leche. debido a la formación de un gel de proteínas leucocitarias, se agrega en partes iguales del reactivo de CMT y la muestra de leche tomada de cada cuarto. Los resultados se clasifican de acuerdo al grado de gelificación como se muestra en la Figura 3 (15).



Figura 3. Interpretación de resultados de la prueba de CMT

a. Negativo: No hay cambios en la leche. b. Rastro de trazas: se observa un ligero sedimento en la parte inferior. c. Una cruz: se forma un gel o un lodo espeso. Dos cruces: formación de grumos, e. En tres cruces hay una formación de coágulo.

Pruebas microbiológicas

Recuento de células somáticas (SCC)

El canal de la glándula mamaria, representa la segunda línea de defensa del sistema inmune innato, siendo la primera las barreras anatómicas y químicas del ápice del pezón, estas incluyen algunas células epiteliales, linfocitos, PMN cuya principal función dentro de la glándula mamaria es la de fagocitosis. La multiplicación de microorganismos incrementa los PMN en el estadio tardío de la infección e interaccionan con el endotelio del tejido e incrementan la producción de oxígeno reactivo (ROS), ocasionando una respuesta inflamatoria. Las bacterias a su vez liberan toxinas, activan los glóbulos blancos y las células epiteliales causan lesiones en el revestimiento de la glándula mamaria y como consecuencia disminuyen la cantidad y calidad de la leche (16).

Cuando el sistema inmune no puede remover a la bacteria, el conteo de SCC sirve para monitorear la calidad de la leche y caracterizar entre cuartos no infectados e infectados que conforman la glándula mamaria. Existen diferentes métodos para realizar el conteo de células somáticas que permitirán a los productores establecer la ocurrencia de la infección intramamaria (IMI) y estimar su frecuencia en grupos de vacas. Por tanto, la in-

formación que brindan será útil principalmente para monitorear los programas de salud de las ubres a nivel del hato, especialmente las prácticas de manejo (17), entre las que se encuentran:

Conteo de Leucocitos por microscopia de luz

Es un método directo, se recolecta leche fresca y se esparcen alrededor de 5-10 μ l de leche en una área de 1 cm² luego se realiza la tinción de azul de metileno, o hematoxilina eosina; otro método más específico es la coloración de Wright, que debido a su opacidad permite observar y contar los PMN, que en los bovinos se pueden diferenciar al observar tres tipos de gránulos: los citoplasmáticos que tienen como función eliminar el microorganismo, los gránulos azurófilos formados durante la etapa de promielocito, y los gránulos específicos (gránulos grandes) que se perciben en las etapas de mielocitos y metamielocitos. Además de estos, se encuentran los gránulos secretorios o vesículas que contienen receptores unidos a la membrana y fosfatasa alcalina (18).

Los valores normales del recuento en leche para PMN o neutrófilos, macrófagos y linfocitos es de aproximadamente 12, 60, y 28%, respectivamente. Sin embargo, en procesos infecciosos los PMN pueden llegar a ser mayores del 90%

del total de leucocitos. Este método sirve para el diagnóstico de mastitis subclínica, aunque su especificidad es baja y no proporciona información sobre el causante de las infecciones (19).

Microscopia electrónica

Se realiza una observación detallada de la muestra de leche, en la cual se observan en los PMN los diferentes gránulos mediante la tinción de May-Grünwald Giemsa (20).

Métodos automatizados para conteo de CS

Se basa en la técnica de la citometría de flujo que mide las características ópticas y la fluorescencia de una célula o algunas otras partículas como microorganismos. Las preparaciones pasan mediante una corriente fluida a través de una fuente de luz

que es directamente proporcional a la dispersión y emisión de fluorescencia; los datos dan información de aspectos bioquímicos, biofísicos, características estructurales de los componentes celulares y propiedades morfológicas, especialmente de la membrana, citoplasma y partículas moleculares como el ADN y ARN (21).

El número de SC sirve para clasificar la mastitis, y se utilizan equipos como el contador de células DeLaval o el Bentley CombSystem 2300, constan de un cassette cuya función es detectar los núcleos presentes de las CS. Otro equipo automatizado es el contador de células Fossomatic, el método fluoro-óptico como el bromuro de etidio y realiza en conteo mediante fluorescencia, en el mercado existen muchos más y cada uno tiene la misma función (22).

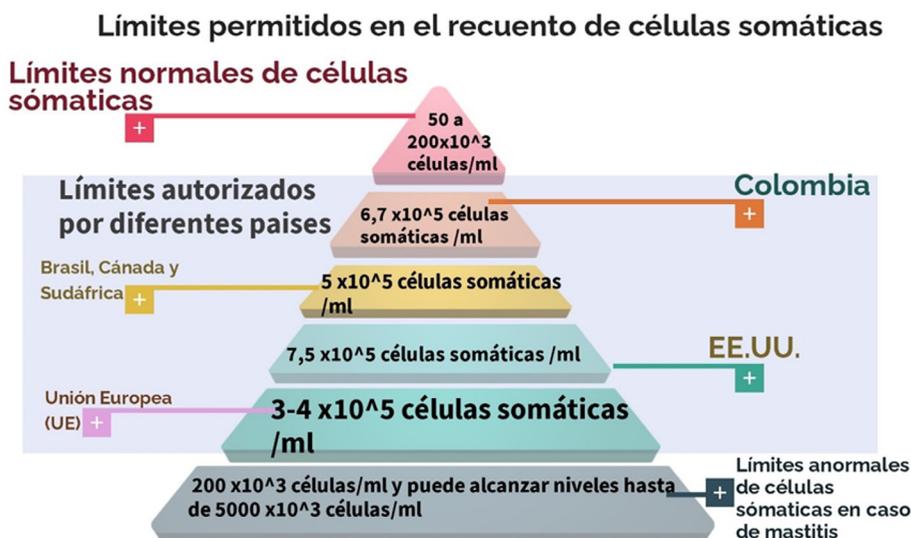


Figura 4. Límites permitidos en el conteo de Células Somáticas en diferentes países. Se observa la diferencia del SCC entre continentes y países (23)(24).

Inmunoensayo

Son desarrollados para medir niveles elevados de antígenos de granulocitos PMN, mediante una ELISA un antisuero policlonal anti-PMN de conejo conjugado con peroxidasa de rábano picante y su sustrato, el peróxido de hidrógeno que en presencia del cromógeno que genera un producto de color amarillo-naranja y mediante espectrofotometría a una absorbancia de a 492 nm. Concluyendo que los recuentos previstos no son significativamente diferentes de los reales del SCC (25).

Aislamientos microbianos

En Colombia, las normas establecidas por el ICA y FEDEGAN teniendo en cuenta las buenas prácticas de ordeño y las Resoluciones 2341 de 2007 y 3585 de 2008 se relacionan con el diagnóstico microbiológico en leche cruda como pasteurizada siendo estos indicadores de higiene sanitaria, procesamiento inadecuado en el ordeño, vigilancia de enfermedades infecciosas en la finca, inadecuada refrigeración, o la presencia de mastitis, contaminación posterior al procedimiento de pasteurización.

Los métodos de análisis microbiológico de carácter obligatorio tanto en leche cruda como pasteurizada son:

Conteo total de bacterias mesófilas: las normas ISO 4833, ISO 21528-2 (26) y las normas INCONTEC NTC 4519:2009 (27). determina los parámetros en la calidad microbiana de la leche, mediante el aislamiento de las bacterias aerobias y anaerobias facultativos, en diluciones seriadas en relación 1:9 con agua peptonada 0.1% e incubadas a una temperatura entre 20-30 °C. Se tienen en cuenta, y para el recuento se selecciona la placa donde el crecimiento bacteriano sea de 20-300 UFC/mL consideradas estadísticamente significativa (28).

Identificación de coliformes: son los mayores microorganismos presentes en leche cruda, incluyen contaminantes ambientales del entorno y contaminación fecal. Se definen como bacilos aerobios o anaerobios facultativos, Gram negativos, oxidasa negativa, no formadores de esporas. Se pueden identificar diferentes microorganismos coliformes pertenecientes a la familia Enterobacteriaceae tolerar las sales biliares y fermentar la lactosa, como *Citrobacter spp.*, *Enterobacter spp.*, *Escherichia spp.*, *Klebsiella spp* y *Serratia spp*, mediante el método del número más probable (NMP) que consiste en inocular por triplicado en el caldo de cultivo lactosado bilis verde brillante diferentes concentraciones en base 10, luego de la incubación con lecturas a las 24 y 48 horas a 32-35 °C. se observa la formación de ácido y gas (29). El siguiente

paso es hacer la lectura de tubos confirmados como positivos y buscar en la tabla de NMP y aplicar una fórmula la cual es NMP de coliformes/g o ml = NMP de la tabla x factor de dilución intermedia/100.

En la leche líquida pasteurizada la presencia de esta bacteria indica una contaminación en el equipo de procesamiento debido a la capacidad que tiene las bacterias de formar biopelícula descrito o como un consorcio funcional de microorganismos unido a una superficie e incrustado en el polímero extracelular o por falla en el proceso de pasteurización (30). Luego teniendo en cuenta la norma ISO 7218:2007 y la Norma Técnica Colombiana 4092:20019 (31) se realizará la identificación bacteriana en medios de cultivo como agar Endo o MacConkey. La identificación bacteriana se utilizan métodos inmunoquímicos o mediante la prueba de IMViC (32).

La mastitis clínica también puede ser causada por cocos Gram positivos, principalmente en aquellos que son catalasa negativos como *S. uberis*, *S. dysgalactiae*, *E. faecalis*, *L. lactis* y *L. garvieae* los cuales son considerados de origen ambiental. Por otro lado, *S. agalactiae* y *S. aureus* se consideran agentes causantes de infección (33). Sin embargo, la mayoría de los patógenos de la mastitis encontrados en

el extremo del pezón, se ha sugerido que la presencia de patógenos menores *S. aureus* y *Corynebacterium spp* pueden proteger contra la infección con patógenos importantes (34).

Microorganismos ambientales característicos de mastitis

En consecuencia, existen otros microorganismos los cuales generan mastitis como *K. pneumoniae*, *S. dysgalactiae*, *Serratia spp*, *Chlamydia spp.*, *P. aureginosa*, *S. uberis*, *M. bovis*, *S. epidermidis*, y *S. simulans*, por lo tanto también se realizan todos los estudios de laboratorio necesarios para poder detectarlos a tiempo y generar un tratamiento oportuno para el bovino afectado por la infección (35).

Diagnóstico microbiológico por Biología Molecular

Para establecer el grado de infección en la glándula mamaria y en la leche de manera exacta los métodos moleculares son los más sensibles y específicos, para determinar la presencia de la bacteria, para lo cual se amplifica el RNA ribosomal 16S (36) siendo este específico de género y especie. También se puede realizar la identificación de genes que causan resistencia o algunas mutaciones a partir de técnicas como: PCR convencional, qPCR, RS-PCR u otras (37).

Técnica de identificación microbiana por MALDI-TOF

La espectrometría de masas de tiempo de vuelo se basa en la desorción / ionización láser asistida por matriz, la cual detecta una gran variedad de proteínas en lugar de sólo moléculas pequeñas, lo que posibilita la caracterización de especies de organismos estrechamente relacionadas. Es usado en la investigación, identificación, tipificación de microorganismos, así como la resistencia a antibióticos y antimicóticos (38).

Diagnóstico de la composición química de la leche

La calidad de la leche por su alto contenido de nutrientes como grasas, carbohidratos, proteínas, y minerales tiene un gran impacto en la dieta de lactantes, de infantes, en los consumidores de edad avanzada, también en la industria láctea y el sector médico. La FAO y el decreto 616 del 2006 (39) describe los parámetros obligatorios que debe cumplir una leche cruda apta para consumo y fabricación de derivados, como, pH, densidad, cantidad de grasa, acidez, índice lactométrico, índice crioscópico, extracto seco total y extracto seco desengrasado (40).

Parámetros físico-químicos

Determinación de pH: Se determina mediante el potencial eléctrico su valor normal es de 6-6.4. (41, 42).

Determinación de la densidad: se realiza de inmediato o en leche fresca bien homogenizada, con un picnómetro o lactodensímetro. La densidad puede ser afectada por la temperatura, entonces se utiliza el método 15/15, lo que indica que la leche colocada en un tubo dentro de agua deben estar 15°C y determina la relación que hay entre la masa (cantidad de grasa y sólidos no grasos) / volumen (43) su valor normal para leche cruda es de 1,030 -1,033 g/mL(44).

Determinación del porcentaje de grasa: la concentración depende del método de ordeño, raza del bovino, estado de lactancia y nutrición, la grasa se encuentra en glóbulos que se encuentran en emulsión cuando se centrifuga estos ascienden espontáneamente a la superficie, teniendo este principio Gerber estandarizó la técnica y su valor normal es 3,5-4% de grasa. Esta medición se encuentra en la Norma FIL-9A:1969 (45).

Determinación del extracto seco y de la humedad: se obtiene mediante desecación 3 mL de leche se colocan a una temperatura de una cápsula de porcelana en calor húmedo por 30 minu-

tos, y luego la desecación se realiza con calor seco a $102^{\circ}\text{C} + 2^{\circ}\text{C}$, para luego es pesada (46). El resultado se expresa en porcentaje y se obtiene después de tomar el peso inicial/ el peso después de la desecación (47). Esta determinación se encuentra dada por la Norma FIL-21:1962 (48). La humedad se define como la pérdida de peso y se expresa en porcentaje. Por lo tanto, existe un reglamento el cual es el siguiente Norma FIL-26:1964 (49)

Determinación de acidez: sirve para identificar contaminación bacteriana mediante titulación, se determina el grado de acidez dado por la fermentación de carbohidratos, tomando 10 mL de leche con una solución de NaOH 0,1 M y como indicador fenolftaleína como indicador, y el pH se determina con un pH-metro. Está establecido por la Norma UNE 34.100 (50).

Reductasa: la presencia de bacterias en leche puede disminuir el proceso de oxido-reducción determinar la calidad higiénica de la leche, a través de la oxido-reducción leche los cuales tiene la función de reducir el azul de metileno (51).

Diagnóstico de nutrientes presentes en la leche

En la leche puede considerarse una fuente de macro y micronutrientes, los elementos inorgánicos presentan

cierto grado de variabilidad dado por los diferentes tratamientos a que son sometidos los bovinos, su composición en promedio es de 87% de agua, 4-5% de lactosa, 3% de proteína, 3-4% de grasa, 0.8% minerales y 0,1% de vitaminas estas concentraciones se pueden alterar en la IMI (52). Tabla 1

Lactosa: favorece la formación de los glicanos, estos a su vez están presentes como oligosacáridos, sintetizados exclusivamente en la glándula mamaria, se pueden encontrar de manera libre o conjugados con péptidos, proteínas o lípidos, ejercen un efecto prebiótico especialmente en los recién nacidos como en la prevención de la adhesión de patógenos, efectos directos sobre las células epiteliales y efectos sistémicos (53).

Proteínas: son fuentes de péptidos bioactivos, liberados por la digestión de caseínas y proteínas de suero conocidos por ser importantes en el control de la ingesta alimentaria respuesta a el estrés y el dolor, la caseína se puede clasificar de $\alpha 1$ -caseína, $\alpha 2$ -caseína y capa caseína (54). En procesos de fermentación causada por bacterias, la acidificación da como resultado la disociación del fosfato de calcio coloidal y facilita la agregación de caseína formando coágulos (55).

Enzimas: se originan de los fagocitos, incluye, las enzimas beta-glucu-

ronidasa, catalasa, plasminógeno, y la enzima lisosomal intracelular N-acetil-D-glucosaminidasa (NAGase), liberada en la leche por los neutrófilos al final del periodo de lactancia se asocia especialmente a infecciones causadas por *S. aureus* y *Staphylococcus coagulasa negativa* (56). La plasmina es usada como indicador de mastitis, pero sus resultados son variables debido a los factores ambientales y fisiológicos. Otras proteínas alteradas en la mastitis es la lactoalbúmina, lipasas, esterasas, fosfatasas, lactato deshidrogenasa, fosfatasa alcalina, arginasa y catalasa, no presenta utilidad como pruebas de detección de mastitis subclínica (57). Los métodos utilizados para determinar estas enzimas son mediante ensayos colorimétricos y fluorométricos (58).

Minerales: son componentes nutricionales que contiene la leche con un gran significado de aporte alimenticio y metabólico esto son: yodo, potasio, sodio, hierro, calcio, magnesio y zinc se determinan mediante la espectrofotometría de absorción atómica y el fósforo mediante método colorimétrico, la disminución de cada uno de ellos se debe principalmente que las bacterias lo pueden tomar como fuente de nutrición Tabla 1 (59).

Tabla 1. Correlación entre el cambio en los minerales, enzimas y componentes de la leche en la mastitis bovina (60).

Disminución	Incremento
α 1 Caseína	Ácidos grasos libres
Ácidos grasos de cadena larga	κ caseína
Lactosa	Albúmina sérica bovina
Calcio	Lactato
Magnesio	Lipasa
Fósforo	Lizosima
Zinc	NAGase
Potasio	B-glucoronidasa
	Plasmina

-Fósforo: Favorece la elasticidad de los músculos en el bovino, se encuentra en la leche en una concentración de 959 mg/L cuando en el bovino existe mastitis, los niveles de fósforo se reducen 85 mg/L. (61, 62).

-Calcio: Favorece el sistema óseo, el metabolismo celular y sanguíneo. (63) Se encuentra en una concentración de 1200 mg/L, en la mastitis este valor disminuye y pueden llegar a 100 mg/L (64).

-Magnesio: Presente en una concentración de 120 mg/L está distribuido en forma micelar (50 mg/L) y en el medio acuoso (70 mg/L), es el mineral que más se disminuye en la mastitis y puede llegar a valores de 13 mg/L (65, 66).

-**Zinc:** Se encuentra asociado con la caseína como un catión divalente, favorece la respuesta inmune y la fertilidad de las vacas. (67) En la leche la concentración, está entre 3 y 4 mg/L., la concentración puede disminuir a 0.21mg/L (68, 69).

-**Hierro:** Ayuda a la formación de hemoglobina, favorece las estructuras de los músculos fibrosos, potencia la acción del sistema inmune, la concentración varía de acuerdo a la metodología utilizada para su determinación, pero en general está 0.5 mg/L (70). Se encuentra asociado con moléculas de caseína, en infecciones su concentración es de 0.4 mg/L (71).

-**Sodio:** en el bovino contribuye en proceso digestivo, se localiza en la fase acuosa de la leche se puede asociar con iones de carga contraria como NaCl, de esta manera contribuye a las propiedades organolépticas de los quesos y actividades enzimáticas durante la madurez. (72) El valor en la leche es de 49 mg/L, con mastitis es de 35 mg/L (73).

-**Potasio:** en el bovino ayuda a la comunicación del sistema nervioso y muscular, favorece la eliminación de detritos celulares y líquidos. El valor normal en la leche es de 152 mg/L y cuando se presenta la mastitis este valor tiende a bajar a un valor de 120 mg/L (74, 75).

-**Yodo:** interviene en procesos neuromusculares y en la producción de la hormonas tiroideas, el valor normal es de 9 mg/L, pero con la infección por microorganismos que producen mastitis puede llegar a niveles de 6 mg/L (76, 77)

Conductividad eléctrica: Existe una alta correlación con CCS, se basa en los cambios iónicos que ocurren durante la inflamación de la glándula mamaria mediante un cambio de pH dados por el aumento del sodio y las concentraciones de cloruro que como consecuencia hay disminución de la grasa (78). La medición de la conductividad eléctrica se puede utilizar en la granja, se requiere una computadora, por lo tanto, este método es fácilmente aplicable (79). Para la mastitis clínica la conductividad eléctrica funciona como un predictor clínico con una sensibilidad 68% y una especificidad del 82% (80). Por otra parte, en cuanto a la mastitis subclínica la sensibilidad y especificidad oscilan de 68% a 61% y 88 % a 66% respectivamente (81).

Conclusiones

Los datos presentados demuestran la importancia del diagnóstico de la mastitis, ya sea por la identificación de patógenos presentes en las glándulas mamarias infectadas, ubres contami-

nadas en el proceso de ordeño o en el entorno de la granja lechera, donde las bacterias, pueden ser un reservorio y causar liberación de metabolitos tóxicos que ocasionan una activación exacerbada en la respuesta inmune dando como resultado el incremento de CS, relacionadas con la concentración de lactosa, alteración en las características físico químicas de la leche, como disminución en la concentración de los minerales, lo cual va alterar la calidad y cantidad de la leche cruda.

Referencias

1. Cremonesi P, Ceccarani C, Giulio Curone G, Severgnini M, Pollera C, Bronzo V, et al/ Milk microbiome diversity and bacterial group prevalence in a comparison between healthy Holstein Friesian and Rendena cows/ [Internet]/PLOS ONE/ 24 Oct 2018/[Cited 3 Ago 2020]/10/Available in: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30356246/>
2. Scholz-Ahrens KE, Ahrens F, Barth CA/ Nutritional and health attributes of milk and milk imitations/[Internet]/ European Journal of Nutrition/ 22 February 2019/[Cited 17 Ago 2020]/ 1(19-34)/ Available in: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30937581/>
3. Macías H, Hinck L/Mammary gland development/[Internet]/ WIREs Developmental Biology/4 April 2012/[Cited 16 Nov 2020]/1(533-557)/Available in:<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.1002/wdev.35>
4. Rabot A, Sinowatz F, Berisha B, Meyer HD, Schams D/Expression and Localization of Extracellular Matrix-Degrading Proteinases and Their Inhibitors in the Bovine Mammary Gland During Development, Function, and Involution/ [Internet]/ American Dairy Science Association/13 September 2006/ [Cited 20 Nov 2020]/ Available in:<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0022030207715588>
5. Hara A, Abe T, Hirao A, Sanbe K, Ayakawa H, Sarantoglou B, et al/ Histochemical properties of bovine and ovine mammary glands during fetal development/[Internet]/ The Journal Veterinary Science/ 15 December 2017/ [Cited 30 Nov 2020]/80 (263-271)/ Available in:<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29249731>
6. Pyörälä S/Indicators of inflammation in the diagnosis of mastitis/[Internet]/ Veterinary Research/ 31 January 2003/ [Cited 2 Sep 2020]/ 34 (565-578)/ Available in:https://www.researchgate.net/publication/9052632_Indicators_of_inflammation_in_the_diagnosis_of_mastitis/link/5465d1c50cf2052b509f8675/download
7. Jamali H, Barkema HW, Mario J, Lavallée-Bourget E-M, Malouin F, Vineet Saini V, et al/ Invited review: Incidence, risk factors, and effects of clinical mastitis recurrence in dairy cows/[Internet]/ American Dairy Science Association/19 January 2018/ [Cited 2 Sep 2020] /101 (4729-4746). Available in:<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S002203021830211X>

8. Zeryehun T, Abera G/ Prevalence and Bacterial Isolates of Mastitis in Dairy Farms in Selected Districts of Eastern Harrarghe Zone, Eastern Ethiopia/ [Internet]/Journal of Veterinary Medicine/ 2 March 2017/[Cited 2 Sep 2020]/2/ Available in:https://www.researchgate.net/publication/314188766_Prevalence_and_Bacterial_Isolates_of_Mastitis_in_Dairy_Farms_in_Selected_Districts_of_Eastern_Harrarghe_Zone_Eastern_Ethiopia
9. Lam TJ, Riekerink RG, Sampimon OC, Smith H/Mastitis diagnostics and performance monitoring: a practical approach/[Internet]/ Irish Veterinary Journal/ 1 April 2009/ [Cited 2 Ago 2020]/62(34-39)/Available in: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3339348/>
10. Oviedo-Boyso J, Valdez-Alarcon JJ, Cajero-Juarez M, Ochoa-Zarzosa A, Lopez-Meza JE, Bravo-Patiño A, Baizabal-Aguirre VM/ Innate immune response of bovine mammary gland to pathogenic bacteria responsible for mastitis/[Internet]/ Journal of Infection/1 August 2006/[Cited 26 Sep 2020]/ 54 (399-409)/ Available in: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16882453/>
11. Wagener MG, Leonhard-Marek S, Häger JD, Pfarrer C/ CD117- and vimentin-positive telocytes in the bovine teat sphincter/[Internet]/Anatomia Histologia Embryologia/6 March 2018/ [Cited 15 Sep 2020]/47/Available in:https://www.researchgate.net/publication/323575553_CD117-_and_vimentin-positive_telocytes_in_the_bovine_teat_sphincter
12. Instituto Colombiano agropecuario/Decretos 1500 de 2007 y 616 de 2006/[Internet]/ Subgerencia de Protección y Regulación Pecuaría Grupo de Inocuidad en Cadenas Agroalimentarias Pecuarias/28 February 2006/[Cited 16 Dec 2020]/Available in:<https://www.ica.gov.co/getattachment/049aef47-c6e3-43d9-826b-e163f8b40e98/Publicacion-23.aspx>
13. FEDEGAN y Instituto Colombiano Agropecuario (ICA)/ Resoluciones 2341 de 2007 y 3585 de 2008/[Internet]/2008/[Cited 10 Dec 2020]/Available in:<https://www.fedegan.org.co/programas/buenas-practicas-ganaderas>
14. Muhammad G, Naureen A, Nadeem MA, Saqib M, Rehman F-ur/Evaluation of a 3% surf solution (surf field mastitis test) for the diagnosis of subclinical bovine and bubaline mastitis/[Internet]/ Tropical Animal Health and Production/2 September 2010/[Cited 5 Ago 2020]/42(457-464). Available in: https://www.researchgate.net/publication/26790199_Evaluation_of_a_3_surf_solution
15. Rossi RS, Amarante AF, Correia LBN, et al/Diagnostic accuracy of Somaticell, California Mastitis Test, and microbiological examination of composite milk to detect Streptococcus agalactiae intramammary infections/[Internet]/ American Dairy Science Association/8 June 2018/[Cited 20 Ago 2020]/101(1-10)/Available in:<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30146291/>
16. Ruegg PL, Pantoja JCF/Understanding and using somatic cell counts to improve milk quality/[Internet]/Irish Journal of Agricultural and Food/9 December 2013/ [Cited 4 Sep 2020]/52 (101-117). Available in: https://www.researchgate.net/publication/259779742_Understanding_and_using_somatic_cell_counts_to_improve_milk_quality

17. Wheeler TT, Ledgard A,GA. Smolenski, Backmann E,McDonald R, Lee RS/Innate immune proteins as biomarkers for mastitis and endometritis/ [Internet]/Australasian Dairy Science/1 November 2012/[Cited 30 jul 2020]/ 5 (294-297).Available in:<https://www.cawthron.org.nz/publication/science-publications/innate-immune-proteins-biomarkers-mastitis-and-endometritis/>
18. Schukkena YH, Günther J, Fitzpatrickc J, Fontainec MC, Goetze L, Holst O, Leigh J, et al/Host-response patterns of intramammary infections in dairy cows/ [Internet]/Veterinary Immunology and Immunopathology/26 August 2011/[Cited 15 Dec 2020]/144(270-289)/Available in:<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21955443/>
19. Ashraf A,Imran M/Diagnosis of bovine mastitis: from laboratory to farm/[Internet]/ Tropical Animal Health and Production/8 June 2018/[Cited 18 Ago 2020]/50(1193–1202).Available in: <https://link.springer.com/article/10.1007/s11250-018-1629-0>
20. Chakraborty S, Dhama K, Tiwari R, Yatoo MI, Khurana SK, Khandia R/Technological interventions and advances in the diagnosis of intramammary infections in animals with emphasis on bovine population-a review/ [Internet]/Veterinary Quarterly/ 5 December 2019/[Cited 1 Sep 2020]/39 (76-94)/ Available in:<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31288621/>
21. Karlsmosea S, Kunstmannb L, Rundstena CF, Kroghc K, Larsenb HKD, Jensena AB, et al/ External quality assurance system (EQAS) for identification of mastitis pathogens in Denmark from 2006 to 2011/[Internet]/ Preventive Veterinary Medicine/1 November 2012/[Cited 31 jul 2020]/109 (271-277)/ Available in:<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23199580/>
22. Martins SA,Martins VC,Cardoso FA, Germano J,Rodrigues M, Duarte C, et al/Biosensors for On-Farm Diagnosis of Mastitis/[Internet]/ Frontiers in Microbiology /31 July 2019/[Cited 20 jul 2020]/ 7(186-193)/Available in:<https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fbioe.2019.00186/full>
23. Alhussien MN, Dang AK/ Milk somatic cells, factors influencing their release, future prospects, and practical utility in dairy animals: An overview/[Internet]/ Veterinary World/ 2 May 2018/ [Cited 15 Nov 2020]/11(562-577) / Available in: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5993762/>
24. Vásquez JF, Loaiza ET, Olivera M/ The hygienic and sanitary quality of raw milk collected from different regions in Colombia/ Journal Scielo/ 28 August 2012/[Cited 19 Nov 2020]/16/ Available in: <http://www.scielo.org.co/pdf/rori/v16n2/v16n2a02.pdf>
25. Robinson PK/Enzymes: principles and biotechnological applications/[Internet]/ Essays in Biochemistry/26 October 2015/ [Cited 29 Ago 2020]/59/Available in:<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4692135/>
26. FAO,OMS,Codex Alimentarius/ normas ISO 4833, ISO 21528-2/[Internet]/11 November 2013/[Cited 17 Dec 2020]/Available in: http://www.fao.org/tempref/codex/Meetings/CCFH/ccfh45/fh45_04_add1s.pdf
27. INCONTEC/ la Norma Técnica Colombiana 4092:20019/[Internet]/16 December 2009/ [Cited 12 Dec 2020]/12/Available in:<http://service.udes.edu.co/modulos/documentos/karenmartinez/50159704-NTC4092.pdf>

28. Tripathy RK, Rath PK, Mishra BP, Panda KS, Jena B/ Clinico-Pathological and Compositional Changes in Milk of Mastitis Cows/[Internet]/ International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences/17 May 2018/ [Cited 28 Jul 2020]/ 7(1680-1687). Available in: <https://www.ijcmas.com/7-6-2018/Rajendra%20Kumar%20Tripathy,%20et%20al.pdf>
29. Ferreira JC, Gomes MS, Bonsaglia EC, Canisso IF, Garrett EF, Stewart JL/Comparative analysis of four commercial on-farm culture methods to identify bacteria associated with clinical mastitis in dairy cattle/[Internet]/ PLOS ONE/15 March 2018/[Cited 22 Jul 2020]/13/Available in: <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0194211>
30. Duarte CM, Freitas PP, Bexiga R/Technological advances in bovine mastitis diagnosis: an overview/[Internet]/Journal of Veterinary Diagnostic Investigation/ 1 November 2015/ [Cited 12 Ago 2020]/ 27 (665–672)/Available in: <https://journals.sagepub.com/doi/full/10.1177/1040638715603087>
31. FAO, INCONTEC /ISO 7218:2007 y la Norma Técnica Colombiana 4092:20019// [Internet]/11 October 2001/[Cited 17 Dec 2020]/Available in: http://www.fao.org/tempref/codex/Meetings/CCFH/ccfh45/fh45_04_add1s.pdf
32. Abrahmsén M, Persson Y, Kanyima BM, Båge R/ Prevalence of subclinical mastitis in dairy farms in urban and peri-urban areas of Kampala, Uganda/[Internet]/Tropical Animal Health and Production/17 August 2013/ [Cited 30 Ago 2020]/46 (99–105). Available in: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3895220/pdf/11250_2013_Article_455.pdf
33. Viora L, Graham EM, Mellor DJ, Reynolds K, Simoes PB, Geraghty TE/ Evaluation of a culture-based pathogen identification kit for bacterial causes of bovine mastitis/[Internet]/Veterinary Record/ 19 June 2014/[Cited 5 Sep 2020]/8/Available in: https://www.researchgate.net/publication/263860017_Evaluation_of_a_culture-based_pathogen_identification_kit_for_bacterial_causes_of_bovine_mastitis
34. Deb R, Amit K, Chakraborty S, Verma KA, Tiwari R, Dhama K, et al/ Trends in Diagnosis and control of Bovine Mastitis: A Review/[Internet]/ Pakistan Journal of Biological Sciences/15 December 2013/[Cited 1 Sep 2020]/16 (1653-1661) Available in: https://www.researchgate.net/publication/260128090_Trends_in_Diagnosis_and_Control_of_Bovine_Mastitis_A_Review/link/0046352fc53d1bc888000000/download
35. Gao J, Liu Y, Wang Y, Li H, Wang X, Wu Y, et al/Impact of yeast and lactic acid bacteria on mastitis and milk microbiota composition of dairy cows/[Internet]/AMB Express/ 29 January 2020/[Cited 30 Jul 2020]/10/Available in: <https://amb-express.springeropen.com/articles/10.1186/s13568-020-0953-8>
36. Shome BR, Mitra S, Bhuvana M, Krithiga N, Velu D, Shome R, et al/Multiplex PCR assay for species identification of bovine mastitis pathogens/[Internet]/ Journal of applied Microbiology/26 September 2011/ [Cited 13 Ago 2020]/111(1349–1356). Available in: <https://sfamjournals.onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/j.1365-2672.2011.05169.x>
37. Türkyılmaz S, Yildiz Ö, Oryaşın E, Kaynarca S, Bozdoğan B/ Molecular Identification of Bacteria Isolated from Dairy Herds with Mastitis/[Internet]/Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi/ 4 January 2010/[Cited 10 Ago 2020] /16 (1025-1032). Available in: https://www.researchgate.net/publication/286123152_Molecular_Identification_of_Bacteria_Isolated_from_Dairy_Herds_with_Mastitis

38. Matuozzo M, Spagnuolo MS, Hussein HA, Gomaa AM, Scaloni A, D'Ambrosio C/ Novel Biomarkers of Mastitis in Goat Milk Revealed by MALDI-TOF-MS-Based Peptide Profiling/ [Internet]/ Biology/ 28 July 2020/ [Cited 10 Ago 2020]/ 9/ Available in: <https://www.mdpi.com/2079-7737/9/8/193/htm>
39. Ministerio de la protección social, ICA/ DECRETO NUMERO 616 DE 2006/ [Internet]/ 28 Febrero 2006/ [Cited 3 Sep 2020]/ 32/ Available in: <https://www.ica.gov.co/getattachment/15425e0f-81fb-4111-b215-63e61e9e9130/2006d616.aspx>
40. Salauddin Md, Akter MR, Hossain MdK, Hussain Nazir KHM, Noreddin A/ Molecular Detection of Multidrug Resistant Staphylococcus aureus Isolated from Bovine Mastitis Milk in Bangladesh/ [Internet]/ Veterinary Sciences/ 30 March 2020/ [Cited 9 Ago 2020]/ 7/ Available in: https://www.researchgate.net/publication/340274116_Molecular_Detection_of_Multidrug_Resistant_Staphylococcus_aureus_Isolated_from_Bovine_Mastitis_Milk_in_Bangladesh
41. Boor KJ, Wiedmann WM, Murphy S, Alcaine S/ A 100-Year Review: Microbiology and safety of milk handling/ [Internet]/ American Dairy Science Association/ 16 June 2017/ [Cited 19 Dec 2020]/ 100(9933–9951)/ Available in: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S002203021731055X>
42. Gitau KG, Bundi RM, Vanleeuwen J, Mulei CM/ Mastitogenic bacteria isolated from dairy cows in Kenya and their antimicrobial sensitivity/ [Internet]/ Journal of the South African Veterinary Association/ 26 February 2014/ [Cited 2 Ago 2020]/ 85 (1–8). Available in: https://www.researchgate.net/publication/262381981_Mastitogenic_bacteria_isolated_from_dairy_cows_in_Kenya_and_their_antimicrobial_sensitivity
43. Patil MP, Nagvekar AS, Ingole SD, Bharucha SV, Palve VT/ Somatic cell count and alkaline phosphatase activity in milk for evaluation of mastitis in buffalo/ [Internet]/ Veterinary World/ 21 March 2015/ [Cited 27 Ago 2020]/ 8(363–366). Available in: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4774844/pdf/VetWorld-8-363.pdf>
44. Shahani K, Harper W, Jensen R, Parry R, Zittle A/ Enzymes in Bovine Milk: A Review/ [Internet]/ Journal of Dairy Science/ 5 May 1973/ [Cited 21 Ago 2020]/ 56(531–543)/ Available in: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0022030273852166>
45. Instituto de Racionalización del Trabajo y Alais, Ch. Física y fisicoquímica/ Norma FIL-9A:1969/ Norma UNE 34.100/ [Internet]/ Agencia Estatal Boletín Oficial del Estado/ 7 Julio 1972/ [Cited 28 Nov 2020]/ 175/ Available in: <https://www.boe.es/buscar/act.php?id=BOE-A-1972-1087>
46. Scholz-Ahrens KE, Ahrens F, Barth CA/ Nutritional and health attributes of milk and milk imitations/ [Internet]/ European Journal of Nutrition/ 1 April 2019/ [Cited 27 Sep 2020]/ Available in: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30937581/>
47. M. Nazmul Hoque, Arif Istiaq, Rebecca A. Clement, Keylie M. Gibson, Otun Saha, Ovinu Kibria Islam, et al/ Insights Into the Resistome of Bovine Clinical Mastitis Microbiome, a Key Factor in Disease Complication/ [Internet]/ Frontiers in Microbiology/ 3 June 2020/ [Cited 1 Ago 2020]/ 11/ Available in: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2020.00860/full>
48. Instituto de Racionalización del Trabajo y Alais, Ch. Física y fisicoquímica/ Norma FIL-9A:1962/ Norma UNE 34.100/ [Internet]/ Agencia Estatal Boletín Oficial del Estado/ 7 Julio 1972/ [Cited 26 Nov 2020]/ 175/ Available in: <https://www.boe.es/buscar/act.php?id=BOE-A-1972-1087>

49. Instituto de Racionalización del Trabajo y Alais, Ch. Física y fisicoquímica/ Norma FIL-9A:1964/ Norma UNE 34.100/[Internet]/ Agencia Estatal Boletín Oficial del Estado/ 7 Julio 1972/ [Cited 28 Nov 2020]/175/ Available in: <https://www.boe.es/buscar/act.php?id=BOE-A-1972-1087>
50. Instituto de Racionalización del Trabajo y Alais, Ch. Física y fisicoquímica/ Norma UNE 34.100/[Internet]/Agencia Estatal Boletín Oficial del Estado/ 7 Julio 1972/ [Cited 22 Nov 2020]/175/Available in: <https://www.boe.es/buscar/act.php?id=BOE-A-1972-1087>
51. Nozad S,Ramin AG,Rezaie SA/Diurnal variations in milk macro-mineral concentrations in Holstein dairy cows in Urmia, Iran/ [Internet]/Veterinary Research Forum/15 December 2012/[Cited 28 Ago 2020]/ 4 (281 - 285)/Available in:https://www.researchgate.net/publication/272080479_Diurnal_variations_in_milk_macro-mineral_concentrations_in_Holstein_dairy_cows_in_Urmia_Iran/link/54e540230cf276cec173b4ce/download
52. Scholz-Ahrens KE, Ahrens F,Barth CA/ Nutritional and health attributes of milk and milk imitations/[Internet]/European Journal of Nutrition/ 1 April 2019/[Cited 27 Sep 2020] /Available in:<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30937581/>
53. Zwierzchowski G, Ametaj BN/Mineral Elements in the Raw Milk of Several Dairy Farms in the Province of Alberta/[Internet]/ Foods/ 14 August 2019/[Cited 15 Ago 2020]/14/Available in:<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31416263/>
54. Fahimi HD, Raj MD, Amarasingttam MD/ Cytochemical localization of lactic dehydrogenase in white skeletal muscle/ [Internet]/THE JOURNAL OF CELL BIOLOGY/ 9 September 1963/[Cited 5 Sep 2020]/22(29-48)/Available in:<https://www.jstor.org/stable/1718380?seq=1>
55. Guoyao WU, MORRIS S/Arginine metabolism: nitric oxide and beyond/[Internet]/ BIOCHEMICAL JOURNAL/15 November 1998/ [Cited 10 Sep 2020]/336(1-17)/Available in:<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1219836/>
56. Zhao X, Lacass P/Mammary tissue damage during bovine mastitis: Causes and control/[Internet]/Journal of Animal Science/ 20 August 2007/[Cited 19 Sep 2020]/86(57-65).Available in:https://www.researchgate.net/publication/6054137_Mammary_tissue_damage_during_bovine_mastitis_Causes_and_control/link/0912f50858a1a9dde1000000/download
57. Díaz A,Loewen PC, Fita I,Carpina X/Thirty years of heme catalases structural biology/ [Internet]/Archives of Biochemistry and Biophysics/23 December 2011/[Cited 18 Sep 2020]/525(102-110)/Available in:https://www.researchgate.net/publication/51973088_Thirty_years_of_heme_catalases_structural_biology
58. Anouar H,Moustapha ME , Taha M, Geesi MH, Farag ZR,Rahim F/Synthesis, Molecular Docking and β -Glucuronidase Inhibitory Potential of Indole Base Oxadiazole Derivatives/[Internet]/Molecules Journal/8 March 2019/[Cited 20 jul 2020]/24/Available in:<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6429331/>
59. Matano C,Kolkenbrock S,Hamer SN, Sgobba E, Moerschbacher BM, Volker FW/ Corynebacterium glutamicum possesses β -N-acetylglucosaminidase /[Internet]/BMC Microbiology/5 August 2016/[Cited 13 Sep 2020]/Available in:<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27492186/>

60. Salina A, Timenetsky J, Barbosa JS, Azevedo CM, Langoni H/Microbiological and molecular detection of *Mycoplasma bovis* in milk samples from bovine clinical mastitis/[Internet]/Brazilian Journal of Veterinary Research/ 9 June 2019/[Cited 7 Ago 2020]40(82-87). Available in: https://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0100-736X2020000200082&script=sci_arttext
61. Yadav V, Panilaitis B, Shi H, Numuta K, Lee K, Kaplan D/N-acetylglucosamine 6-phosphate deacetylase (*nagA*) is required for N-acetyl glucosamine assimilation in *Gluconacetobacter xylinus*/[Internet]/PLOS ONE/2 June 2011/ [Cited 16 Ago 2020]/6/ Available in: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21655093/>
62. Nickerson SC, Pankey JW/Cytologic observations of the bovine teat end/[Internet]/American Journal of Veterinary Research/2 Ago 1983/[Cited 17 Sep 2020]/44(1433-41). Available in: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/6625294/>
63. Foppena JW, Schijvenb JF/Evaluation of data from the literature on the transport and survival of *Escherichia coli* and thermotolerant coliforms in aquifers under saturated conditions/[Internet]/Science Direct/ 15 November 2005/[Cited 19 Sep 2020]/40(401-426)/Available in: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16434075/>
64. Bekele T, Lakew M, Terefe G, Koran T, Olani A, Yimesgen L, et al/Study on bovine mastitis with isolation of bacterial and fungal causal agents and assessing antimicrobial resistance patterns of isolated *Staphylococcus* species in and around Sebeta town, Ethiopia/[Internet]/African Journal of Microbiology Research/17 July 2018/[Cited 28 Ago 2020]/13(23-32)/Available in: https://www.researchgate.net/publication/331121236_Study_on_bovine_mastitis_with_isolation_of_bacterial_and_fungal_causal_agents_and_assessing_antimicrobial_resistance_patterns_of_isolated_Staphylococcus_species_in_and_around_Sebeta_town_Ethiopia
65. Martin NH, Boor KJ, Wiedmann M/Effect of post-pasteurization contamination on fluid milk quality/[Internet]/American Dairy Science Association/14 September 2017/[Cited 14 Oct 2020]/101(1-10)/ Available in: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29103726/>
66. Zigo F, Elečko J, Vasil' M, Ondrašovičová S, Zigová M, Takáč L, et al/Mastitis pathogens isolated from samples of milk in dairy cows herds of Slovak spotted cattle / [Internet]/ Veterinary Sciences and Medicine/20 May 2019/[Cited 3 Ago 2020]/2/Available in: <https://www.semanticscholar.org/paper/Mastitis-pathogens-isolated-from-samples-of-milk-in-Vasi%C4%BE-Ondra%C5%A1ovi%C4%8Dov%C3%A1/189e46a9a81e8ded37ace776c76e56d43b884797>
67. Akineden Ö, Hassan AA, Schneider E, Usleber E/A coagulase-negative variant of *Staphylococcus aureus* from bovine mastitis milk/[Internet]/Journal of Dairy Research/1 December 2010/[Cited 17 Jul 2020]/(78) 38-42. Available in: <https://www.cambridge.org/core/journals/journal-of-dairy-research/article/coagulasenegative-variant-of-staphylococcus-aureus-from-bovine-mastitis-milk/36243C0880A3DDB76EE39731827BD0C5>

68. Persson Y, Olofsson I/ Direct and indirect measurement of somatic cell count as indicator of intramammary infection in dairy goats/[Internet]/Acta Veterinaria Scandinavica/4 March 2011/[Cited 5 Sep 2020]/53/Available in:https://www.researchgate.net/publication/50286974_Direct_and_indirect_measurement_of_somatic_cell_count_as_indicator_of_intramammary_infection_in_dairy_goats
69. C. Syring ,R. Boss , M. Reist , M. Bodmer ,J. Hummerjohann ,P. Gehrig, et al/Bovine mastitis: The diagnostic properties of a PCR-based assay to monitor the Staphylococcus aureus genotype B status of a herd, using bulk tank milk/[Internet]/American Dairy Science Association/25 February 2012/ [Cited 25 jul 2020]/95 (3674–3682). Available in:<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22720925/>
70. Roth Z ,Dvir A,Kalo D ,Lavon Y, Krifucks O,D. Wolfenson D, et al/Naturally occurring mastitis disrupts developmental competence of bovine oocytes/ [Internet]/ American Dairy Science Association/ 2 July 2013/ [Cited 10 Ago2020]/96(6499–6505).Available in: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23957998/>
71. Oliveira L,Hulland PC, Ruegg L/ Characterization of clinical mastitis occurring in cowson 50 large dairy herds in Wisconsin/[Internet]/American Dairy Science Association/9 August 2013/[Cited 27 jul 2020]/(96)7538–7549. Available in:<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24119795/>
72. Mahmmod Y/ The future of PCR technologies in diagnosis of bovine mastitis pathogens / [Internet] /Advances in Dairy Research/24 December 2013/2/Available in:<https://www.longdom.org/abstract/academic-publishing-in-the-21st-century-past-trends-future-optionsp-20710.html>
73. E. Royster ,S. Godden , D. Goulart , A. Dahlke , P. Rapnicki ,J. Timmerman/Evaluation of the Minnesota Easy Culture System II Bi-Plate and Tri-Plate for identification of common mastitis pathogens in milk/[Internet]/ American Dairy Science Association/24 february 2014/[Cited 20 jul 2020] /97(3648–3659). Available in: https://www.researchgate.net/publication/306374911_Evaluation_of_the_Minnesota_Easy_Culture_System_II_Bi-Plate_and_Tri-Plate_for_identification_of_common_mastitis_pathogens_in_milk
74. Afaf, D. Abdel-maged, El Sheita A.M. A. , Abdelwahab MG/Biochemical study of DNA markers for Bacterial infection in bovine mastitis/[Internet]/BENHA VETERINARY MEDICAL JOURNAL/ 7 December 2016/ [Cited 19 jul 2020]/(31) 93-100.Available in:https://bvmj.journals.ekb.eg/article_31275.htm
75. Schmidt T,Kock MM, Ehlers MM/Molecular Characterization of Staphylococcus aureus Isolated from Bovine Mastitis and Close Human Contacts in South African Dairy Herds: Genetic Diversity and Inter-Species Host Transmission/ [Internet] / Frontiers in Microbiology/ 6 April 2017/[Cited 11 Ago 2020]/8/Available in:<https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2017.00511/full>
76. Vakkamäki J, Taponen S, Heikkilä AM, Pyörälä S/Bacteriological etiology and treatment of mastitis in Finnish dairy herds/[Internet]/ Acta Veterinaria Scandinavica/25 May 2017/[Cited 17 jul 2020]/59/ Available in: <https://actavetscand.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13028-017-0301-4>

77. Malik MA, Ijaz M, Aqib AI, Farooqi SF, Hussain K/ The Prevalence and Associated Risk Factors of Coa Gene (Coagulase Positive Staphylococcus aureus) from Bovine Milk/ [Internet] /Kafkas Universitesi Veteriner Fakultesi Dergisi Journal/ 2 June 2017/[Cited 15 Ago 2020]. Available in: https://www.researchgate.net/publication/317310048_The_Prevalence_and_Associated_Risk_Factors_of_Coa_Gene_Coagulase_Positive_Staphylococcus_aureus_from_Bovine_Milk
78. A. Muhee, H. U. Malik, Asharaf O. S, Shah A, Jan Muheet, et al /Biochemical and Mineral Alterations of Milk Chemistry in Mastitis/ [Internet]/International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences/30 June 2017/[Cited 15 jul 2020]/7 (4591-4594). Available in: https://www.researchgate.net/publication/320139495_Biochemical_and_Mineral_Alterations_of_Milk_Chemistry_in_Mastitis
79. Leimbach S, Krömker V/Laboratory evaluation of a novel rapid tube test system for differentiation of mastitis-causing pathogen groups/[Internet]/American Dairy Science Association/ 7 March 2018/ [Cited 6 Ago 2020]/101(6357–6365)/Available in: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29655563/>
80. Kabir MdH, Ershaduzzaman MdE, Giasuddin Md, Nazir KHM, Mahmud MdM, Islam MdR/ Prevalence and molecular detection of the causal agents of sub-clinical mastitis in dairy cows in Sirajganj and Pabna districts, Bangladesh/[Internet]/Journal of Advanced Veterinary and Animal Research/21 December 2017/[Cited 13 Ago 2020] /4(378-384). Available in: <https://www.banglajol.info/index.php/JAVAR/article/view/35381bn>
81. Satu Pyörälä/ Indicators of inflammation in the diagnosis of mastitis/[Internet]/ Veterinary Research/31 January 2003/ [Cited 29 Ago 2020]/ 34 (565–578)/ Available in: https://www.researchgate.net/publication/9052632_Indicators_of_inflammation_in_the_diagnosis_of_mastitis/link/5465d1c50cf2052b509f8675/download