

# RECuento ELECTRÓNICO DE CÉLULAS SOMÁTICAS APLICADO A LA DETECCIÓN DE MASTITIS SUBCLÍNICA BOVINA EN FINCAS LECHERAS DE LOS ESTADOS ARAGUA Y CARABOBO, VENEZUELA

## Electronic Somatic Cells Count Applied to Detection of Subclinical Mastitis in Milk Herds of Aragua-Carabobo States, Venezuela

Aura M. Scaramelli A.<sup>1</sup>, Luciano Ferraro R.<sup>2</sup> y Héctor Troya<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Salud Pública. <sup>2</sup>Departamento de Sanidad Animal.

Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Central de Venezuela, Apartado 4563. Maracay, Edo. Aragua, Venezuela

### RESUMEN

Se realizó Recuento Electrónico de Células Somáticas (RECS) y cultivo bacteriológico en 1.386 muestras de leche de cuartos individuales, procedentes de 358 vacas de seis fincas de los estados Aragua y Carabobo, Venezuela. Los resultados agrupados fueron usados para evaluar la utilidad del RECS para predecir presencia de infección subclínica en cuartos de ubre, a varios valores umbrales y sobre la base de los resultados de una sola muestra. Se estudio además, la influencia del número de lactancias y etapa de lactación sobre los resultados del RECS y se exploró, de manera preliminar, la utilidad del RECS en leche de tanque para predecir la prevalencia de infección en las fincas. La prevalencia general de infección en cuartos fue 25,54% (354/1.386); 241 (17,39%) con patógenos mayores (*S. aureus*, *S. agalactiae*, *Streptococcus* spp., *Enterococcus* spp., coliformes, *Pseudomonas aeruginosa*, y *A. pyogenes*) y 113 (8,15%) con patógenos menores (*Corynebacterium bovis*, *Micrococcus* spp., *Staphylococcus* spp., distintas a *S. aureus*). La media general del log<sub>10</sub> del RECS fue 5,68 ± 0,42. Las medias del log<sub>10</sub> del RECS para los cuartos no infectados, infectados con patógenos menores y mayores fueron 5,53 ± 0,28; 5,84 ± 0,34 y 6,27 ± 0,41 respectivamente; el análisis de varianza demostró diferencias significativas entre todas ellas (P<0,01). Usando 500.000 cél/ml como umbral de normalidad del RECS, fue posible la correcta clasificación del 82,03% de los cuartos, con igual probabilidad de falsos positivos y falsos negativos. El número de lactancias ejerce efecto significativo sobre el RECS (P<0,01), no así la etapa de lactación (P>0,05).

La correlación entre el RECS en leche de tanque y la prevalencia general de infección en las fincas fue baja ( $r_1 = 0,38$ ) y no significativa (P>0,05), pero más estrecha y estadísticamente significativa (P<0,05) al considerar sólo el nivel de infección con patógenos mayores ( $r_2 = 0,85$ ).

**Palabras clave:** Recuento electrónico de células en leche, mastitis subclínica.

### ABSTRACT

Electronic somatic cell counting (RECS) and bacteriological culture was performed on 1.386 milk quarters samples from 358 cows in 6 herds of Aragua and Carabobo states, Venezuela. The pooled data were used to valuation the accuracy of RECS to predict subclinical infection in udder quarters, over one simple sample, at various thresholds. Additionally, the influence of number and stage of lactation on RECS was studied, and the relationship between infections prevalence and RECS in bulk tank milk of herds was explored preliminarily. The general prevalence of quarter infection was 25.54% (354/1.386); 241 (17.54%) by mayor pathogens (*S. aureus*, *S. agalactiae*, *Streptococcus* spp., *Enterococcus* spp., coliforms, *Pseudomonas aeruginosa*, y *A. pyogenes*) and 113 (8.15%) by minor pathogens (*Corynebacterium bovis*, *Micrococcus* spp., *Staphylococcus* spp., others which *S. aureus*). Mean arithmetic of log<sub>10</sub> RECS was 5.68 ± 0.42. Arithmetic means of log<sub>10</sub> RECS from non-infected quartes, infected by minor pathogens and mayor pathogens were 5.53 ± 0.28; 5.84 ± 0,34 y 6.27 ± 0.41 respectively; the analysis of variance showed signicant differences between all them (P<0,01). Using a threshold of 500,000 cell/ml was possible the right classification of 82.03%

quarters. The parity exert a significative ( $P < 0.01$ ) effect onto the RECS. The effect of stage of lactation was no significative. The correlation between bulk tank milk RECS and general prevalence in the herd was low ( $r_1 = 0.38$ ) and no significative ( $P > 0.05$ ), but was more close ( $r_2 = 0.85$ ) and significative ( $P > 0.05$ ) when its considered the RECST and prevalence of mayor pathogens.

**Keys words:** Electronic somatic cell counts, subclinical mastitis.

## INTRODUCCIÓN

En los últimos 30 años, el Recuento electrónico de células somáticas (RECS) en leche ha sido ampliamente usado en los países europeos, U.S.A y Canadá, para demostrar inflamación de la glándula mamaria [14, 15, 24, 31, 37]. Ha sido considerada como una excelente prueba para mastitis debido a la amplia gama de información que puede aportar [40, 41]. Así mismo, se ha señalado que RECS en leche de tanque (RECST) es el mejor indicador tanto de la situación de la mastitis a nivel de fincas, como de la calidad de la leche producida [6]; existe evidencia experimental de que los RECS por encima de 100.000 células/ml tienen un impacto negativo sobre el rendimiento de la leche para la elaboración de productos, como sobre la calidad de los mismos [1, 43], y muchos países han incorporado el RECST a los esquemas de control de calidad de la leche [23]. Además, se ha señalado que el promedio del RECS (previamente transformado al sistema lineal de Shook) [48] del rebaño, describe la situación de la mastitis en las vacas representativas de la finca [12], y permite estimar las pérdidas por leche no producida, gracias a la relación lineal que guarda con la producción [15, 32, 33, 44].

El valor límite o umbral del RECS usado para la clasificación de los cuartos y/o animales como infectados o no, así como el valor del RECST, aplicado para la ejecución de programas de estímulo y penalización, varían entre países y se han reducido paulatinamente en aquellos en los que se mantienen programas nacionales de control de mastitis y producción de leche de calidad. Así, en los Estados Unidos de Norteamérica, el contenido de células somáticas en leche se considera como un indicador de la calidad más no de la seguridad de leche y se aplica un límite de RECST de 750.000 cel/ml [20], mientras que en los países de la Comunidad Económica

Europea (CEE), está considerado como un indicador de calidad y seguridad de la leche, utilizando como límite 400.000 células/ml [49]. Para la clasificación de los cuartos y/o los animales infectados, se han aplicado diferentes valores límites o umbrales de normalidad [29, 38, 46], pero los valores de 500.000 células/ml y 300.000 células/ml, fueron recomendados y/o usados durante muchos años [10]. En el Reino Unido, el promedio global del RECS en leche compuesta de los cuatro cuartos de la ubre es de 178.000 células/ml [20], y se han sugerido umbrales de 150.000 a 250.000 células/ml [1, 46]. En Argentina, se ha usado como límite de normalidad el valor de 240.000 células/ml, correspondiente a la media geométrica de la leche de cuartos no infectados [21].

Aunque ha sido bien demostrado que la principal fuente de variación en el RECS en leche de cuartos, ubre o tanque es la infección [33, 47, 45], hay otros factores que pueden afectar el número de células somáticas presentes en la leche [8, 10, 14, 25, 34, 44, 47].

Para la selección y aplicación de una prueba diagnóstica y la interpretación de sus resultados, se requiere su evaluación previa. El análisis de la especificidad y sensibilidad es una evaluación válida para cualquier prueba diagnóstica, especialmente si se consideran las variaciones entre poblaciones, debidas a la existencia de factores que pueden alterar la distribución del parámetro medido por la prueba [16, 28]. De allí la importancia de evaluar las pruebas diagnósticas a aplicar e identificar los errores potenciales de la misma. En Venezuela, no se han realizado estudios previos, por lo que no existe información al respecto. Por lo tanto, los objetivos del presente trabajo fueron: 1) Calcular la sensibilidad, especificidad y efectividad del RECS para predecir presencia de infección subclínica en cuartos de ubre, a diferentes valores umbrales. 2) Sugerir un valor umbral o límite de normalidad para el RECS en leche de cuartos y 3) Estudiar la influencia del número de lactancias y etapa de lactación sobre el resultado del RECS.

## MATERIALES Y MÉTODOS

Fue incluido en el presente estudio un total de cinco fincas comerciales (A-E) y una finca experimental de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad Central de Venezuela (F). La TABLA I resume las características generales de las fincas. El número de animales fue 358 animales para un total de 1.432 cuartos, de los cuales 21 (1,47%) eran improductivos.

TABLE I  
CARACTERÍSTICAS GENERALES DE LAS FINCAS

Finca	A	B	C	D	E	F
Raza <sup>1</sup>	H	M	H y M	M	H	H
Total De Animales	16	32	104	79	56	71
Nº de lactancias (Rango, $\bar{X} \pm DS$ )	1-9; $\bar{X} = 2,38 \pm 1,83$					
Días en lactancia (Rango, $\bar{X} \pm DS$ )	10-563; $236,09 \pm 130,25$					

<sup>1</sup> H= Holstein. M= Mestizas.

vos, restando 1.411 cuartos, los efectivamente estudiados. Los animales con signos de mastitis clínica fueron excluidos. Cada finca fue visitada en una ocasión, durante el ordeño vespertino, y a partir de todos los animales en ordeño, se obtuvieron muestras de 15-20 ml de leche de cada cuarto por separado, en tubos de vidrio estériles, con tapa de rosca, respetando estrictamente las recomendaciones de la Federación Internacional de Lecherías (International Dairy Federation: IDF) [24].

Al finalizar el ordeño se recolectó una muestra de 500 ml de leche del tanque de cada finca, en envases de vidrio estériles, con tapa de rosca, para realizar RECS. Las muestras fueron transportadas en cavas con hielo hasta el laboratorio, donde fueron inmediatamente procesadas, o guardadas a 4°C hasta su procesamiento dentro de las 24 horas siguientes a su recolección [11, 24, 36].

### Estudio bacteriológico

Las muestras fueron dejadas a la temperatura ambiental hasta alcanzar una temperatura de 18-20°C. Usando asa de platino calibrada, se sembraron alícuotas de 25 µl de cada muestra, usando asa de platino calibrada, sobre la mitad de la superficie de placas de Agar Sangre (AS), Agar Sal Manitol y Medio de Edward modificado. Todas las placas se incubaron a 37°C por 48 horas. Las placas de AS y Medio de Edward se incubaron en campanas con vela para proveer atmósfera con 5% de CO<sub>2</sub> [11, 17, 24, 36]. Los resultados fueron interpretados y registrados de acuerdo a criterios los siguientes criterios [38]:

**a) Cuarto no infectado o cultivo negativo:** desarrollo de menos de 5 colonias de igual o diferente tipo.

**b) Cuarto infectado o cultivo positivo:** desarrollo de más de 5 colonias del mismo tipo o de por lo menos 8 colonias de dos tipos distintos como máximo. Cuando se obtuvo desarrollo de dos patógenos mayores (PM) se registró la muestra como infectada por una mezcla de agentes, cuando se obtuvo desarrollo de un patógeno mayor (PM) y otro menor (Pm) se registró como positiva al patógeno mayor (PM).

**c) Muestra contaminada:** desarrollo de más de dos agentes. Estas muestras fueron excluidas de los análisis ulteriores. La identificación de los aislados se realizó de acuerdo a esquemas y métodos previamente descritos y recomendados [11, 24]. En la categoría de patógenos mayores se incluyeron: *S. aureus*, *S. agalactiae*, *S. dysgalactiae*, *S. uberis*, otros estreptococos, coliformes, *Pseudomonas aeruginosa*, y *A. pyogenes* y en la de patógenos menores se incluyeron: *Corynebacterium bovis*, *Micrococcus* spp., *Staphylococcus* spp., coagulasa positiva (ECP) distintas a *S. aureus* y *Staphylococcus* spp., coagulasa negativa (ECN) [38].

### Recuento electrónico de células

Inmediatamente después de la siembra de las muestras, se extrajeron 10 ml de leche, se colocaron en tubos de 20 ml

de capacidad, limpios, con tapa de rosca, y se procesaron de acuerdo a la técnica descrita y recomendada por la IDF [24]; el recuento se realizó con un contador electrónico -Coulter Counter- modelo F (Coulter Electronics™). Para cada muestra se prepararon cuatro diluciones y de los correspondientes recuentos se escogieron los tres más semejantes, cuyo promedio simple se registró como el recuento definitivo.

### Análisis estadístico

Para el RECS se consideraron diferentes umbrales y los RECS de las muestras se consideraron positivos cuando resultaron iguales o mayores que el umbral. Se calculó la probabilidad de infección (Pi) para cada valor límite de RECS, así como la especificidad, sensibilidad, eficiencia, valor predictivo positivo y negativo probabilidad de falsos positivos y probabilidad de falsos negativos, de acuerdo a la definición de los mismos [16, 28, 39, 46], asumiéndose una prevalencia de infección constante e igual a la prevalencia general encontrada en el presente estudio [28, 29].

Los valores del RECS de cada muestra fueron transformados a escala logarítmica para normalizar la distribución y estabilizar la varianza [48]. Se calculó la media aritmética y la desviación estándar de los valores absolutos y logarítmicos de los RECS para la totalidad de las muestras, así como para los cuartos incluidos en cada clase bacteriológica (no infectados, infectados con patógenos menores e infectados con patógenos mayores). Los resultados del cultivo bacteriológico fueron codificados asignando valor cero a los resultados negativos, 1 a los infectados con patógenos menores y 2 a los infectados con patógenos mayores. Para estudiar el efecto del número de lactancias se establecieron 6 clases, desde la primera a la quinta lactancia, y en la sexta se agruparon los resultados correspondientes a animales con 6 o más lactancias. Para la etapa de lactancia se establecieron 6 clases, cada una de 60 días de duración excepto la última, en la que se agruparon los datos de animales con más de 300 días en ordeño. Sobre la totalidad de los datos, se realizaron diferentes análisis de análisis de varianza [50] para cada factor en estudio (clase bacteriológica, número de lactancias y etapa de lactancia); todos los factores fueron considerados fijos. Finalmente, se establecieron 72 grupos de acuerdo a la clase bacteriológica (dos clases: infectados y no infectados), lactancia (seis clases) y etapa (seis clases), se calcularon las medias del log<sub>10</sub> del RECS para cada grupo y se realizó un análisis de varianza para probar, sobre el conjunto de datos, los efectos primarios e interacciones de la etapa y número de lactaciones y estado bacteriológico [50]. Para las comparaciones de medias se usó la prueba de LSD. Para evaluar independencia entre dos o más criterios de clasificación se utilizó prueba de Ji-cuadrado. Se calculó también el coeficiente de correlación entre el RECS en leche de tanque y la prevalencia de infección y prevalencia de patógenos mayores de cada finca [50].

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Estudio bacteriológico

De los 1.411 cuartos estudiados, 25 (1,77%) se clasificaron como contaminados y los resultados correspondientes fueron excluidos de los análisis ulteriores. De los 1.386 cuartos que arrojaron resultados interpretables, 1.032 (74,45%) cuartos fueron clasificados como no infectados (cultivo negativo) y 354 (25,54%) como infectados al permitir el aislamiento de alguno de los patógenos mastitogénicos comunes. A partir del 68,08% (241/354) de los cuartos positivos al cultivo, se aisló alguno de los patógenos mayores, siendo los más frecuentes: *S. aureus* (93), *S. agalactiae* (51) y del 31,92% (113/354) se recuperó alguno de los patógenos menores: *Staphylococcus* spp. coagulasa negativa y *C. bovis*.

La prevalencia de cuartos infectados varió entre fincas en el rango de 21,58% a 31,25% para las fincas F y A respectivamente; la prueba de Ji-cuadrado aplicada para estudiar independencia entre las variables finca y el número de cuartos infectados, reveló diferencias no significativas ( $P < 0,05$ ). Una posible explicación para los resultados obtenidos sería el pequeño número de fincas incluidas y la similitud en cuanto al manejo. Muchos autores han encontrado variaciones en la prevalencia de infección y tipo de agentes [13, 19, 51] y este hecho ha sido señalado como una de las características de la mastitis [9]. En todas las fincas, la prevalencia de patógenos mayores (particularmente *S. aureus* y *S. agalactiae*), fue superior a la de los patógenos menores, con la única excepción de la finca A, en la que la totalidad de los animales experimentaban su primera lactancia. La prevalencia de *S. agalactiae* varió entre 0% (para la finca F) y 10,5%; en todas las fincas se detec-

tó presencia de cuartos infectados con *S. aureus* cuya prevalencia osciló entre 1,6% para la finca A y 13,8% para la finca B.

En la TABLA II se presentan los resultados del cultivo microbiológico para cada finca.

### Recuento electrónico de células somáticas en leche de cuartos (RECS)

En la TABLA III se presenta el número de cuartos no infectados, infectados y totales para cada rango de RECS, y la probabilidad de infección (Pi) dentro de cada rango. El porcentaje de cuartos infectados aumenta en la medida en que se incrementa el RECS. Las ligeras inconsistencias en esta tendencia podrían atribuirse al desequilibrio en la distribución de los cuartos en cada rango de RECS, particularmente al pequeño número en algunos de ellos.

Estos resultados son comparables a los obtenidos por otros autores [10, 38]. Sobre muestras compuestas (cuatro cuartos de ubre), se ha reportado la misma tendencia [29]. Sin embargo, los porcentajes de cuartos infectados en los diferentes rangos de RECS, son diferentes a los encontrados en las investigaciones precitadas, probablemente debido no sólo a las diferencias en la prevalencia de infección y tipo de patógenos predominantes en las poblaciones estudiadas [29, 38], sino también a diferencias experimentales en cuanto a tipo de muestra usada [29], metodología de recuento [10, 29], métodos y criterios bacteriológicos aplicados [10], entre otros.

En la TABLA IV se presentan las medias aritméticas y desviaciones estándar de los valores absolutos y logarítmicos del RECSC en cada clase bacteriológica.

TABLA II  
RESULTADOS DEL CULTIVO BACTERIOLÓGICO REALIZADO A LA TOTALIDAD DE LOS CUARTOS EN LAS DIFERENTES FINCAS

Resultados del Cultivo	Fincas						Total
	A	B	C	D	E	F	
Negativo	44	86	287	230	167	218	1032
1.- <i>C. bovis</i>	2	4	11	4	7	6	34
2.- ECN y <i>Micrococcus</i> spp.	12	7	8	13	20	19	79
3.- <i>S. aureus</i>	1	17	37	21	7	10	93
4.- <i>S. agalactiae</i>	2	3	42	2	2	0	51
5.- Otros estreptococos y enterococos	2	3	4	28	13	17	67
6.- <i>A. pyogenes</i>	0	0	0	0	1	1	2
7.- Coliformes	1	1	2	2	6	7	19
8.- Mezclas de patógenos mayores	0	2	8	0	0	0	10
9.- Total Patógenos menores ( $\Sigma$ 1-2)	14	11	19	17	27	25	113
10.- Total Patógenos mayores ( $\Sigma$ 3-8)	6	26	93	53	29	35	241
Total positivos ( $\Sigma$ 9-10)	20	37	112	70	55	60	354
Total positivos (%)	31,25	30,08	28,07	23,33	24,77	21,58	25,54

**TABLA III**  
**NÚMERO Y (%) DE CUARTOS INFECTADOS Y NO INFECTADOS Y PROBABILIDAD DE INFECCIÓN (Pi)**  
**PARA CADA RANGO DEL RECuento ELECTRÓNICO DE CÉLULAS SOMÁTICAS**

Rango del RECS (X1.000 cel/ml)	Número de cuartos			Pi
	No infectados	Infectados	Total	
0-100	13 (86,7)	2 (13,3)	15	0,13
101-200	188 (95,9)	8 (4,1)	196	0,04
201-300	263 (97,0)	8 (3,0)	271	0,03
301-400	236 (92,2)	20 (7,8)	256	0,08
401-500	140 (88,1)	19 (11,9)	159	0,12
501-600	39 (73,6)	14 (26,4)	53	0,26
601-700	22 (61,1)	14 (38,9)	36	0,39
701-800	28 (62,5)	15 (37,5)	43	0,35
801-900	21 (61,5)	15 (38,5)	36	0,42
901-1.000	14 (63,6)	8 (36,4)	22	0,36
1.001-2.000	58 (31,0)	129 (69,0)	187	0,69
2.001-3.000	8 (22,2)	28 (77,8)	36	0,78
3.001-4.000	0 (0,0)	20 (100,0)	20	1,00
4.001-5.000	0 (0,0)	10 (100,0)	10	1,00
>5.000	2 (4,3)	44 (95,7)	46	0,96
Total	1.032	354	1.386	-

**TABLA IV**  
**MEDIAS Y DESVIACIONES ESTÁNDAR DE LOS VALORES ABSOLUTOS Y LOGARÍTMICOS DEL RECS**  
**EN LA LECHE DE CUARTOS EN CADA CLASE BACTERIOLÓGICA.**

Clase bacteriológica	N	RECS		Log. RECS	
		$\bar{X}$	DE	$\bar{X}$	DE
No infectados	1032	425.848	419.765	5,53	0,28
Patógenos menores	112	930.123	736.510	5,84	0,34
Patógenos mayores	241	3.043.126	3.997.420	6,27	0,41

Los RECS más elevados se asocian a presencia de patógenos mayores; los patógenos menores producen ligeros incrementos en el RECS. El análisis de varianza demostró la existencia de diferencias altamente significativas ( $P < 0,01$ ), entre las medias del logaritmo del RECS de las muestras no infectadas, infectadas con patógenos menores e infectadas con patógenos mayores.

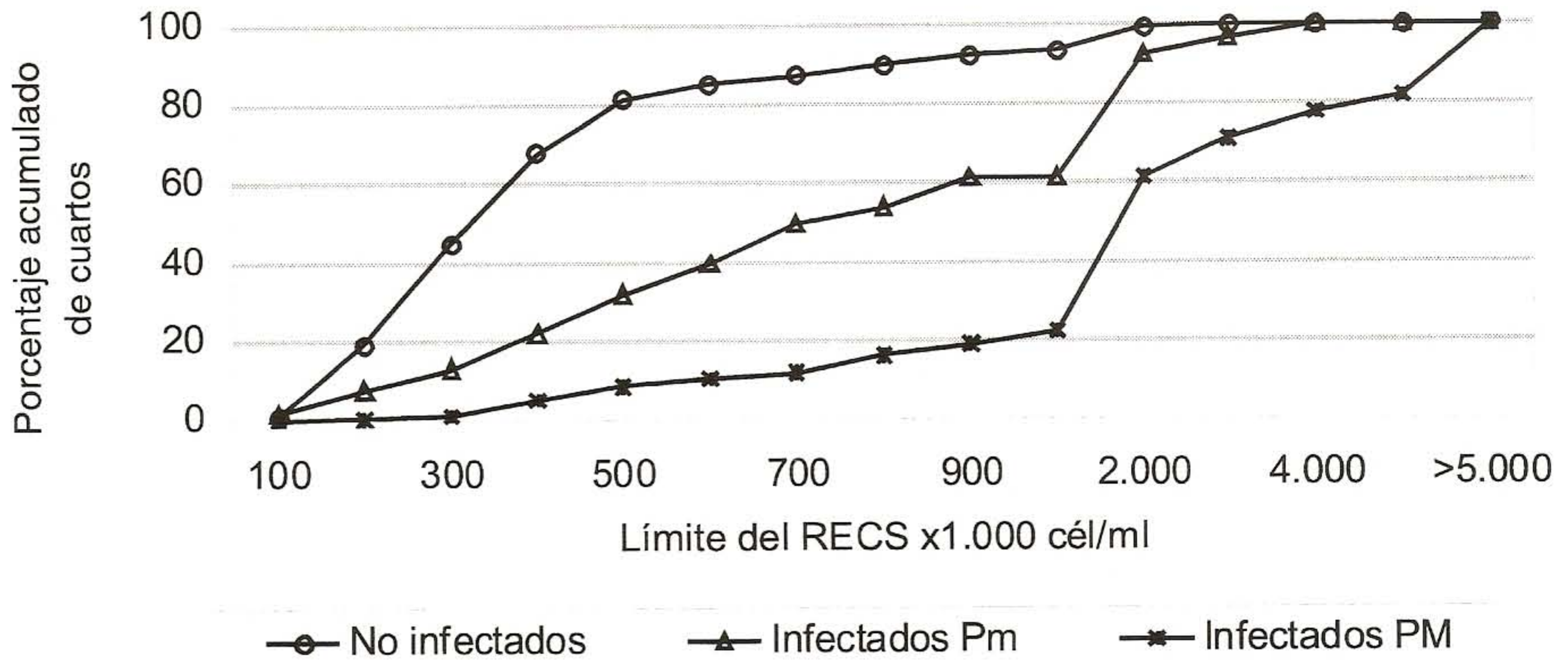
Blackburn [7] ha reportado medias de  $0,41 \times 10^6$  cel/ml.,  $0,75 \times 10^6$  cel/ml y  $3,60 \times 10^6$  cel/ml para las muestras no infectadas, infectadas con patógenos menores y mayores respectivamente; otros investigadores [18] han encontrado medias del logaritmo del RECS de 5,52; 5,73 y 5,92 células /ml para cada grupo, semejantes a las encontradas en la presente investigación; Kitchen y col., [26] detectaron valores medios de 0,246; 0,562 y 2,109 millones de células/ml para cada uno de los grupos.

En la FIG. 1 se presenta el porcentaje acumulado de cuartos para cada clase bacteriológica y para cada rango de RECS.

En un estudio realizado sobre un total de 6.560 muestras de leche de cuartos se encontró que el 23%, 67%, 93%, 96% y 98% de los cuartos no infectados o infectados con patógenos menores, presentaron RECS por debajo de los límites de  $1 \times 10^5$ ;  $2 \times 10^5$ ;  $5 \times 10^5$ ;  $7 \times 10^5$ ; y  $10 \times 10^5$  células/ml; el 35% de los cuartos infectados con patógenos mayores tenía RECS inferiores a  $4 \times 10^5$  células/ml [38].

En el presente estudio, en el 81,39% (840/1.032) de los cuartos no infectados, el RECS fue inferior a 500.000 células/ml, mientras que el 83,89% (297/354) de los infectados con patógenos mayores o menores, arrojaron valores superiores a este valor. El 44,96% (464/1.032) de los cuartos no infectados se encontró por debajo de 300.000 células/ml, mientras que el 94,92% (336/354) de los infectados superaba este umbral, FIG. 1 y TABLA V.

Con respecto a la efectividad del RECS para discriminar entre cuartos infectados y no infectados, en la TABLA V se presentan la Sensibilidad, Especificidad, Efectividad, Valor



**FIGURA 1. PORCENTAJE ACUMULADO DE CUARTOS NO INFECTADOS, INFECTADOS CON PATÓGENOS MENORES (Pm) E INFECTADOS CON PATÓGENOS MAYORES (PM), PARA CADA LÍMITE DEL RECS.**

**TABLA V**

**SENSIBILIDAD, ESPECIFICIDAD, EFECTIVIDAD, VALOR PREDICTIVO POSITIVO Y NEGATIVO Y PROBABILIDAD DE ERROR PARA FALSOS POSITIVOS Y NEGATIVOS, PARA CADA VALOR LÍMITE DEL RECuento ELECTRÓNICO DE CÉLULAS SOMÁTICAS EN LECHE DE CUARTOS**

Límite del RECS X 1000 cel/ml	N° de cuartos > Límite		N° de cuartos < Límite		S	E	Efect.	VP		P	
	Infectados	Total	No Infectados	Total				+	-	F+	F-
100	352	1371	13	15	99,44	1,26	26,33	0,26	0,87	0,987	0,006
200	344	1175	201	211	97,18	19,48	39,32	0,29	0,95	0,805	0,028
300	336	904	464	482	94,92	44,96	57,72	0,37	0,96	0,550	0,051
400	316	648	700	738	89,27	67,83	73,30	0,49	0,95	0,322	0,107
500	297	489	840	897	83,90	81,40	82,03	0,61	0,94	0,186	0,161
600	283	436	879	950	79,94	85,17	83,84	0,65	0,93	0,148	0,201
700	269	400	901	986	75,99	87,31	84,42	0,67	0,91	0,127	0,240
800	254	357	929	1029	71,75	90,02	85,35	0,71	0,90	0,100	0,282
900	239	321	950	1065	67,51	92,05	85,79	0,74	0,89	0,079	0,325
1000	231	299	964	1087	65,25	93,41	86,22	0,77	0,89	0,066	0,347
2000	102	112	1022	1274	28,81	99,03	81,10	0,91	0,80	0,010	0,712
3000	74	76	1030	1310	20,90	99,81	79,65	0,97	0,79	0,002	0,791
4000	54	56	1030	1330	15,25	99,81	78,21	0,96	0,77	0,002	0,847
5000	44	46	1030	1340	12,43	99,81	77,49	0,96	0,77	0,002	0,876
5000	44	46	1032	1386	12,43	100,00	77,63	0,96	0,74	0,002	0,876

Sensibilidad = N° de cuartos infectados > límite del RECS/Total de infectados X 100.

Especificidad = N° de cuartos no infectados < límite del RECS/ Total de no infectados X 100.

Efectividad = N° de cuartos no infectados < límite + N° de cuartos infectados > límite/ Total de cuartos X 100.

Valor Predictivo Negativo = N° de cuartos no infectados < límite/ Total de cuartos < límite.

Valor Predictivo Positivo = N° de cuartos infectados > límite/Total de cuartos > límite.

Probabilidad de Falso Positivo = N° de cuartos no infectados > límite /N° total de cuartos no infectados.

Probabilidad de Falso Negativo = N° de cuartos infectados < límite /N° total de cuartos infectados.

Probabilidad de Error = Probabilidad de Falso Positivo + Probabilidad de Falso negativo.

predictivo positivo y negativo, y probabilidad de error para cada valor límite del RECS.

La sensibilidad de la prueba disminuye a medida que se aumenta el valor umbral para la clasificación, e inversamente, el Valor predictivo positivo aumenta. Inversamente, la especificidad de la prueba aumenta a medida que se incrementa el valor umbral para la clasificación, mientras que el Valor Predictivo negativo disminuye. Sobre muestras de leche compuesta (cuatro cuartos de ubre), se han reportado los siguientes valores: Sensibilidad=0,52; Valor predictivo positivo=0,60; Especificidad=0,89 y Valor predictivo negativo=0,85, para un valor umbral de 500.000 células/ml [29].

Fernando y col. [18], utilizando un valor límite del logaritmo del RECS de 6,05, equivalente a 1.122.018 cel/ml, se encontró un 25% de muestras falsas positivas y un 59,2% de falsas negativas. En el presente trabajo, para los valores umbrales de 900.000 cel/ml y  $1 \times 10^6$  células/ml, el porcentaje de muestras erróneamente clasificadas fue sustancialmente menor, alcanzando sólo un 14,21% (8,29% de falsas negativas y 5,92% de falsas positivas).

Se ha señalado que la prevalencia de infección afecta el valor predictivo positivo y negativo del RECS, por lo que el valor umbral para la clasificación de los cuartos y/o los animales, debería escogerse en función de la situación de cada finca y del objetivo que se persigue con la prueba [16, 29, 38]; así, si el RECS se utiliza como método de diagnóstico de mastitis en programas de control, deben evaluarse las consecuencias económicas derivadas de la aplicación del umbral escogido para la clasificación de los cuartos o animales [29]. Además de la prevalencia de infección, el efecto de factores distintos a la infección, p. e., edad de los animales [8, 10, 14, 47], raza [3, 10] y etapa de lactancia [8] sobre el RECS, han sido utilizados

como argumento para apoyar el uso de valores umbrales relativos, más que fijos.

Sheldrake y col. [46], concluyeron que el RECS es el método más confiable para la predicción de infecciones en los cuartos, sobre la base de los resultados de una sola muestra y propusieron usar como límite de normalidad, el valor del RECS al cual la probabilidad de falsos positivos iguala la de falsos negativos; en dicho estudio ese valor límite fue 200.000 células/ml. En la FIG. 2, se presenta la probabilidad de falsos positivos y falsos negativos para cada rango del RECS; el punto donde las líneas se cruzan, se corresponde con el RECS al cual la probabilidad de un resultado falso positivo iguala a la de un falso negativo; consecutivamente, para el RECS correspondiente, la proporción de animales erróneamente clasificados como positivos igualará a la de animales erróneamente clasificados como negativos [46]. Para el conjunto de datos del presente trabajo, el punto de cruce se corresponde con una probabilidad de error de 0,174 y con un RECS de 532.000 células/ml.

Seleccionando dicho valor umbral y asumiéndose una prevalencia de infección en los cuartos de ubre, igual a la encontrada en el presente estudio (25,54%), los parámetros del RECS, serían: Sensibilidad = 82,48%; Especificidad = 82,56%; Efectividad = 82,54%; Valor Predictivo positivo = 0,62 y Valor predictivo negativo = 0,93. El número de cuartos infectados erróneamente clasificados como negativos sería 62 y el número de erróneamente clasificados como positivos sería 180.

#### Influencia del número de lactancias y etapa de lactación sobre el RECS

Se observó un incremento de las medias aritméticas del logaritmo del RECS, tanto para los cuartos infectados como los no infectados; en éstos, el máximo valor promedio para el

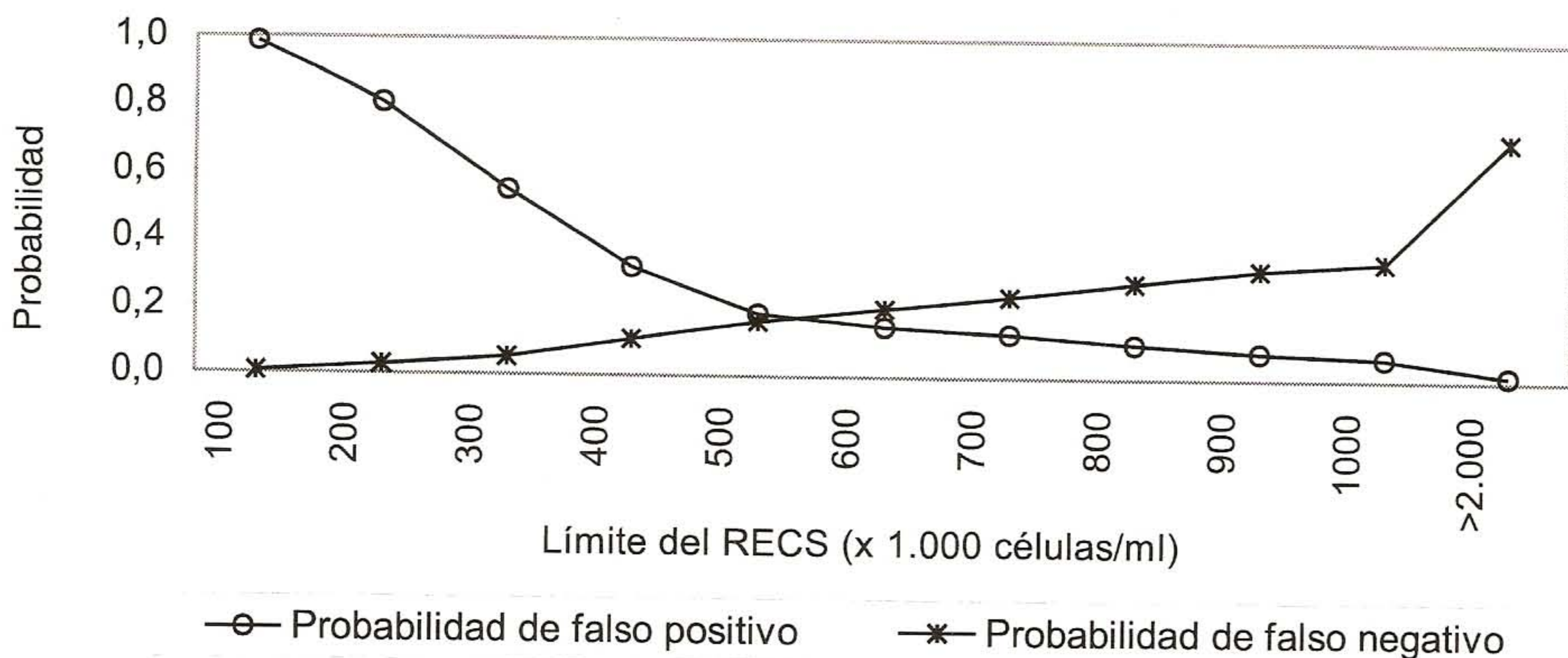


FIGURA 2. PROBABILIDAD DE FALSOS POSITIVOS Y FALSOS NEGATIVOS PARA CADA VALOR LÍMITE DEL RECUENTO ELECTRÓNICO DE CÉLULAS SOMÁTICAS.

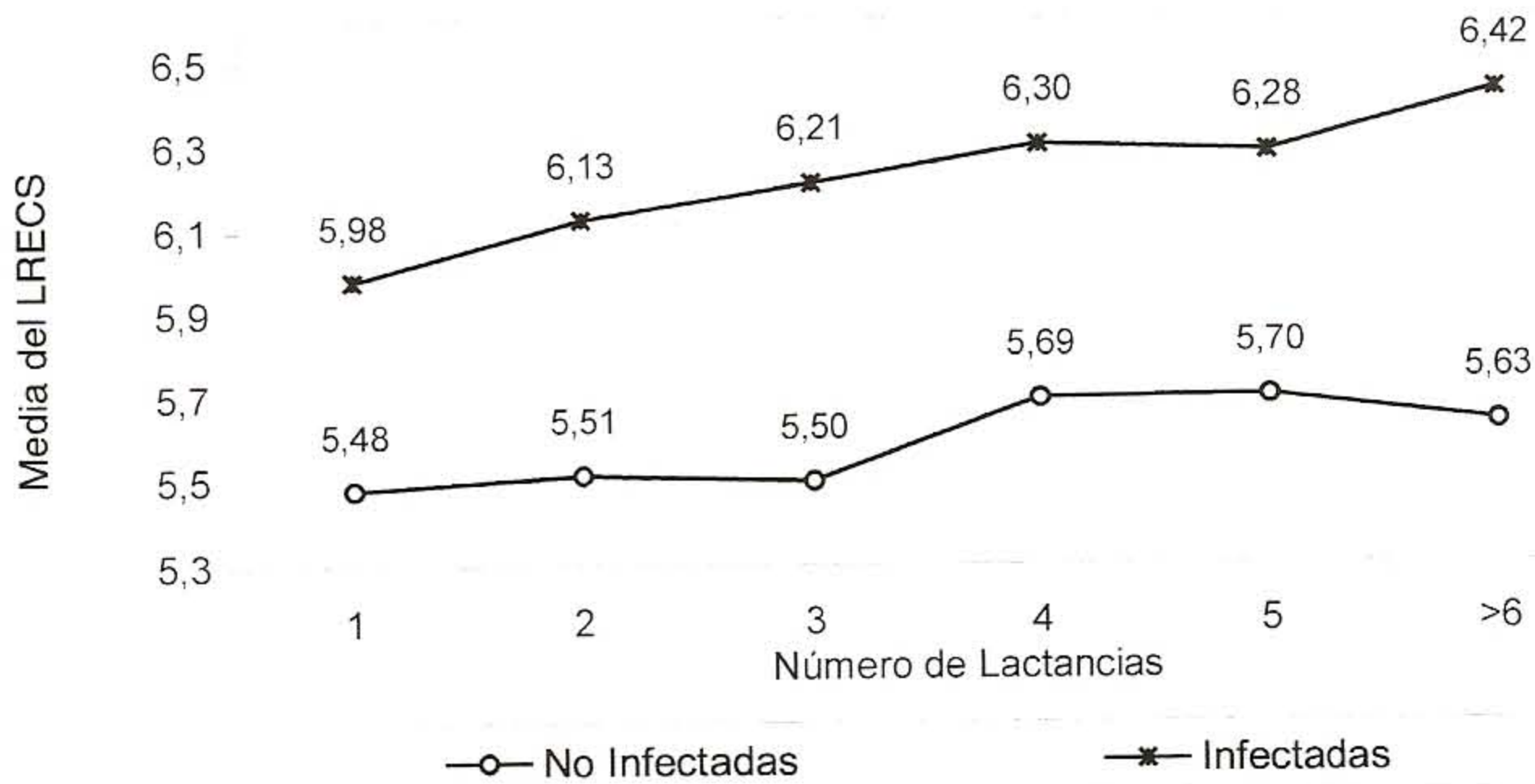


FIGURA 3. INFLUENCIA DEL NÚMERO DE LACTANCIAS SOBRE EL RECS, EN CUARTOS INFECTADOS Y NO INFECTADOS.

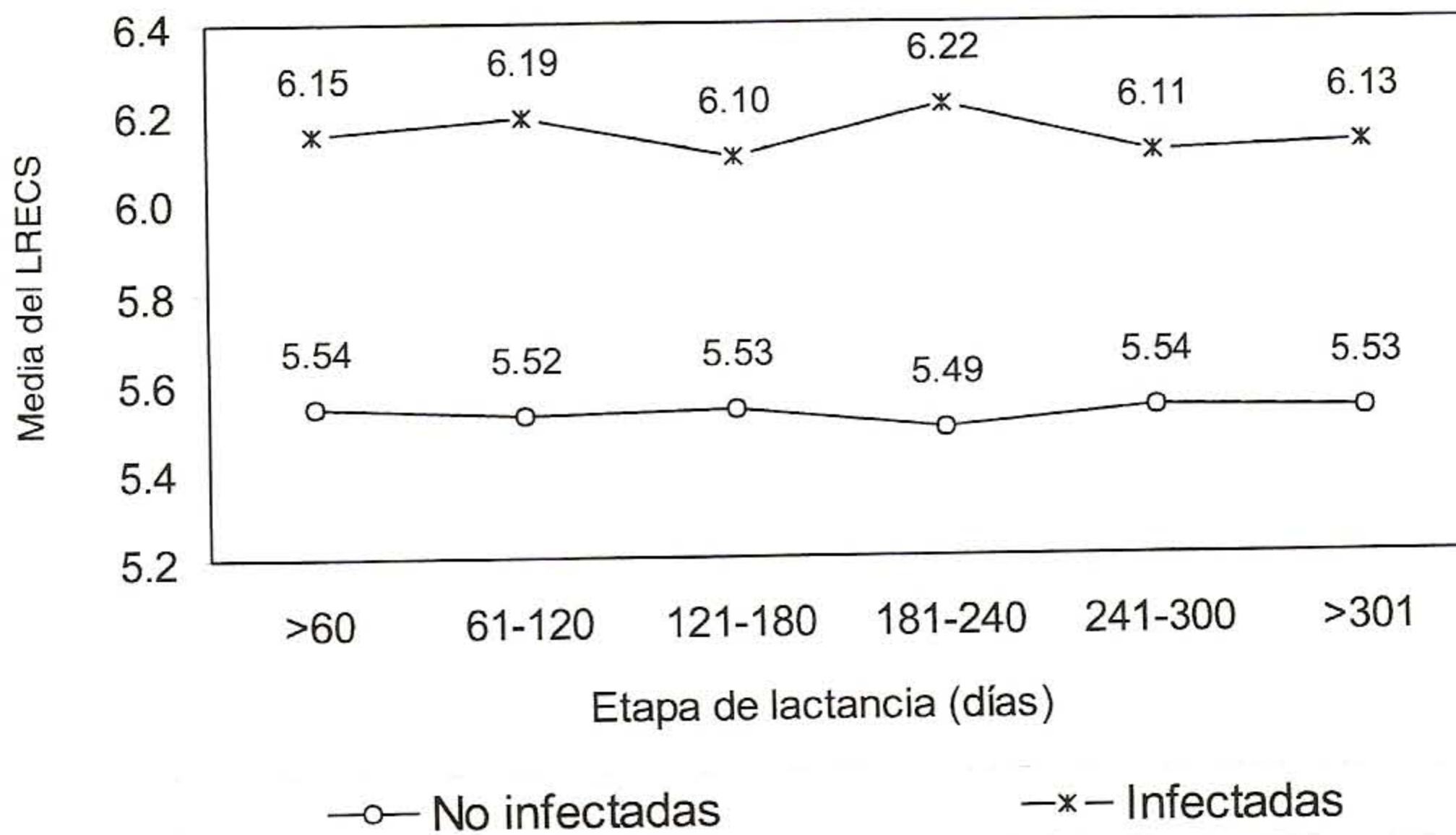


FIGURA 4. INFLUENCIA DE LA ETAPA DE LACTANCIA SOBRE EL RECS EN CUARTOS INFECTADOS Y NO INFECTADOS.

logaritmo del RECS fue 5,75 (557.186 células/ml), correspondiente a los animales en quinta lactancia. En la FIG. 3 se presentan las medias aritméticas del logaritmo del RECS en los cuartos infectados y no infectados para las distintas lactancias.

El análisis de varianza reveló efecto significativo del número de lactancias ( $P < 0,01$ ) sobre el RECS; la interacción número de lactancias x clase bacteriológica resultó no significativa ( $P = 0,4420$ ). En la comparación de medias se encontró que, la de la primera lactación difiere significativamente ( $P < 0,01$ ) de las medias de la segunda, tercera y éstas de las siguientes. Brolund [10] ha reportado efecto significativo del número de lactancias y de la interacción número de lactancias x clase bacteriológica; en cambio, otros autores reportan efecto significativo del efecto principal pero no de la interacción [27]. Dohoo y col. [15] concluyeron que el valor de RECS usado para la clasificación de los cuartos como infectados o no infectados, debe incrementarse a medida que aumenta la edad del animal

o el número de lactancias. En muchas investigaciones se han reportado resultados similares, [14, 35, 42, 44, 45]. Se han sugerido algunas explicaciones de este hecho: RECS elevados como secuela de infecciones ya resueltas [35]; mayor prevalencia de infección en vacas viejas, debido a la repetida exposición a diferentes patógenos [45]; presencia de infecciones debidas a patógenos menores, no considerados en los criterios bacteriológicos aplicados [7] (probablemente valida para los animales en primera lactancia en los cuales estos patógenos son frecuentes [10, 40]). Otros investigadores han reportado incrementos relacionados al número de lactaciones, pero sólo en los cuartos infectados, particularmente con *S. aureus* y con un ligero incremento en los cuartos libres de infección [47]. Recientemente se han reportado resultados similares [27].

En relación al efecto de la etapa de lactación sobre el RECS, los resultados se ilustran en la FIG. 4.



TABLA VI

**PREVALENCIA GENERAL DE INFECCIÓN, PREVALENCIA DE PATÓGENOS MAYORES Y RESULTADOS DEL RECuento ELECTRÓNICO DE CÉLULAS SOMÁTICAS EN LECHE DE TANQUE, PARA CADA UNA DE LAS FINCAS**

Parámetro	Fincas					
	A	B	C	D	E	F
RECST (x 1.000 cél/ml)	824	1.299	1417	845	724	966
Prevalencia general de infección (%)	31,2	30,1	28,1	23,3	24,8	21,6
Prevalencia de Patógenos mayores (%)	9,4	21,1	23,3	17,7	12,6	12,6

El análisis de varianza reveló que la etapa de lactación no tiene un efecto significativo ( $P = 0,0872$ ) sobre el RECS.

El valor máximo en los animales no infectados correspondió a aquellos con más de 360 días en ordeño y la media del logaritmo del RECS fue 5,63 equivalente a 426.580 cél/ml, valor inferior al del valor límite "ideal" para la población incluida en este estudio, sugiriendo que el efecto etapa de lactancia, es poco relevante a los efectos de la interpretación del resultado del RECS con fines diagnósticos.

En general, los resultados obtenidos a partir de los cuartos no infectados, concuerdan con los reportados por otros investigadores, [25, 35]. Muchos autores han detectado incrementos significativos en el RECS sólo al final de la lactación [3, 4, 5, 10, 42, 44]. El fenómeno ha sido explicado como resultante de infecciones no detectadas [35]; algunos autores lo atribuyen al efecto de concentración que se produce al disminuir la producción de leche [33], ya que la curva del RECS a lo largo de la lactación es el inverso de la curva de producción de leche [40].

#### Recuento electrónico de células somáticas en leche de tanque

En la TABLA VI, se presentan los resultados del RECS en la leche del tanque, prevalencia de infección general y prevalencia de infección con patógenos mayores, para cada una de las seis fincas incluidas en el estudio preliminar.

Aunque el RECS en leche de tanque está sujeto a considerables variaciones [22, 30], ha sido usado para estimar la prevalencia de infección en las fincas, vigilar el desarrollo de programas de control y estimar las pérdidas debidas a la disminución de la producción causadas por la mastitis subclínica.

El coeficiente de correlación entre el RECS en la leche del tanque y el porcentaje total de cuartos infectados fue  $r_1 = 0,38$  estadísticamente no significativo ( $P > 0,05$ ); entre el RECST y el porcentaje de cuartos infectados con patógenos mayores, fue  $r_2 = 0,85$ , estadísticamente significativo ( $P < 0,05$ ). En condiciones experimentales semejantes, se han calculado coeficientes de correlación similares tanto al primero (sobre 5 fincas;  $r_1 = 0,43$ ) [51], como al segundo (sobre 29 fincas;  $r_1 = 0,7138$ ;  $r_2 = 0,8786$ ) [37]. Se ha reportado que sobre la base de un solo RECS en leche de tanque, es posible predecir la prevalencia de infección en sólo el 45,5% de las fincas, pero

que el porcentaje aumenta a 80% al considerar el promedio de los 5 últimos RECS mensuales, previos al estudio de los cuartos individuales [31].

Esta bien documentada la relación lineal existente entre la producción de leche y el RECS en la leche de tanque; los incrementos en el RECST se asocian a disminuciones en la producción. Las estimaciones de esa pérdida oscilan entre 1,5 y 3% por cada incremento de 100.000 células/ml a partir de la base de 150.000 células/ml [15, 32, 33]; si se asumen como válidas estas estimaciones (tomando la media entre ambas: 2,25%) y se aplican a los RECST encontrados en las seis fincas, se tendrá que producen 5,06%; 25,9%; 28,4%; 15,64%; 12,9% y 18,4% menos leche de la que podrían producir.

#### CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

Los resultados indican que usando como umbral del RECS 532.000 cél/ml, es posible identificar el 82,48% de los cuartos infectados, sin gran pérdida de especificidad (82,56%), por lo que se logra un 82,54% de clasificaciones correctas. Parece adecuado sugerir como valor umbral, un RECS de 500.000 cél/ml, para la población en estudio.

Aunque el número de lactancias podría afectar el RECS, su influencia es sensiblemente menor a la causada por la infección. La etapa de lactancia no afectó significativamente el RECS.

Con las reservas derivadas del pequeño número de fincas y muestras incluidas en el ensayo preliminar, el RECS en leche de tanque parece ser un buen indicador de la prevalencia de patógenos mayores.

Dado que el RECS puede ser automatizado, proveería un método sencillo y de muy bajo costo para establecer un sistema de vigilancia de mastitis y mejoramiento de la calidad de la leche producida, particularmente en las zonas del país en las que se concentra el rubro.

#### AGRADECIMIENTO

Esta investigación se realizó gracias al soporte financiero del Consejo de Desarrollo Científico y Humanístico (CDCH) de la Universidad Central de Venezuela.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] BARBANO, D.M. Impact of mastitis on dairy product quality and yield: research update. **Proc. 28th Ann. Mtg. National Mastitis Council**. Tampa, Florida. February 9-11: 44-48. 1989
- [2] BARKEMA, H.W.; SCHUKKEN, Y.H.; LAM, T.J.G.M.; GALLIGAN, D.T.; BEIBOER, M.L.; BRAND, A. Estimation of interdependence among quarters of bovine udder with subclinical mastitis and implications for analysis. **J. Dairy Sci.** 80: 1592-1599. 1997.
- [3] BATRA, T.R.; MCALLISTER, A. J. A. Comparison of mastitis detection methods in dairy cattle. **Can. J. Anim. Sci.** 64: 305-312. 1984.
- [4] BATRA, T.R. The incidence of subclinical mastitis and related pathogens in two lines of dairy cattle. **Can. J. Anim. Sci.** 60: 743-748. 1980.
- [5] BATRA, T.R.; MCALLISTER, A. J. Incidence of subclinical and clinical mastitis in pureline and crossline dairy cattle. **Can. J. Anim. Sci.** 63: 773-780. 1983.
- [6] BENNET, R.H. Milk quality and mastitis: The management connection. **Proc. 26th Annual Mtg. Natl. Mastitis Council**. Orlando, Florida, Feb. 20-23: 133-150. 1987.
- [7] BLACKBURN, P.S. The cell count of cow's milk and the micro-organisms cultured from the milk. **J. Dairy Res.** 35: 59-65. 1968.
- [8] BODOH, G.W.; BATTISTA, W.; SCHULTZ, L.H.; JOHNSTON, R.P. Variation in somatic cell counts in dairy herd improvement milk samples. **J. Dairy Sci.** 59: 1119-1123. 1976.
- [9] BRAMLEY, A. J.; DODD, F.H. Reviews of the progress of dairy science: Mastitis control-progress and prospects. **J. Dairy Res.** 51: 481-512. 1984.
- [10] BROLUND, L. Cell counts in bovine milk. Causes of variation and applicability for diagnosis of subclinical mastitis. **Act. Vet. Scand. Suppl.**, 80: 1-123. 1985.
- [11] BROWN, R.W.; MORSE, G. E.; NEWBOLD, F. H. S.; SLANETZ, L. W. Microbiological Procedures for the Diagnosis of Bovine Mastitis. **National Mastitis Council Inc.**, Washington, DC. 26 pp. 1969.
- [12] CRIST, W. The new somatic cell count score: What it is and how to use it in mastitis management. **Proc. 25th. Ann. Mtg. National Mastitis Council**. Columbus, Ohio. February 9-12: 133-136. 1986.
- [13] DODD, F.H.; WESTGARTH, D.R.; GRIFFIN, T.K. Strategy of mastitis control. **J. Am. Vet. Med. Assc.** 170, (10): 1124-1128. 1977.
- [14] DOHOO, I.R.; MEEK, A.H.; MARTIN, S.W.; BARNUM, D.A. Use of total and differential Somatic cell counts from composite milk samples to detect mastitis in individual cows. **Can. J. Comp. Med.** 45: 8-14. 1981.
- [15] DOHOO, I.R.; MEEK, A.H.; MARTIN, S.W.; BARNUM, D.A. Somatic cell counts in bovine milk: Relationship to production and clinical episodes of mastitis. **Can. J. Comp. Med.** 48: 130-135. 1984
- [16] DOHOO, I.R. Evaluating mastitis test. **Proc. 29th. Ann. Mtg. National Mastitis Council**. Louisville, Kentucky. February 12-14: 68-75. 1990.
- [17] FARNSWORTH, R.J. Integrating microbiology into mastitis programs. **Proc. 21st Ann. Mtg. National Mastitis Council**. Louisville, Kentucky. February 15-18: 26-30. 1982
- [18] FERNANDO, R.S.; SPAHR, S.L.; JASTER, E.H. Comparison of electrical conductivity of milk with other indirect methods for detection of subclinical mastitis. **J. Dairy Sci.** 68: 449-456. 1985.
- [19] FERRARO, L. Análisis de prevalencia de mastitis subclínica en vacas lecheras en Venezuela, mediante la prueba de California Mastitis test (CMT) y bacteriología. Universidad Central de Venezuela, Facultad de Ciencias Veterinarias. (Trabajo de Ascenso). 80pp. 1992.
- [20] FOX, M.W. Feasibility of international somatic cell count standards. **J.A.V.M.A.** 212: 1541. 1998.
- [21] GIRAUDO, J.A.; CALZOLARI, A.; RAMPONE, H.; RAMPONE, A.; GIRAUDO, A.T.; BOGNI, C.; LARRIESTRA, A.; NAGEL, R. Field trials of a vaccine against bovine mastitis, 1. Evaluation in heifers. **J. Dairy Sci.** 80: 845-853. 1997.
- [22] HOGAN, J.S.; HOBLET, K.H.; SMITH, K.L.; SCHOENBERGER, P.S.; TODHUNTER, D.A.; HUESTON, W.D.; PRITCHARD, D.E.; BOWMAN, G.L.; HEIDER, L.E.; BROCKETT, B.L.; CONRAD, H.R. Bacterial and somatic cell counts in bulk tank milk counts in ten well managed herds. **J. Food Protect.** 51: 930-937. 1988.
- [23] HUBBLE, I.B. Testing and reporting of raw milk quality. **Austral. J. Dairy. Technol.** 52: 102-108. 1997.
- [24] International Dairy Federation. Laboratory methods for use in mastitis work. **Document.** 132: 1-26. 1981.
- [25] KENNEDY, B.W.; SETHAR, M.S.; TONG, A.K.W.; MOXLEY, J.E.; DOWNWY, B.R. Environmental factor influencing test-day somatic cell count in Holstein. **J. Dairy Sci.** 65: 275-280. 1982.
- [26] KITCHEN, B. J.; KWEE, W.S.; MIDDLETON, G.; ANDREWS, R.J. Relationship between the level of n-acetyl-B-D-glucosaminidase (NAGnase) in bovine milk and the presence of mastitis pathogens. **J. Dairy Res.** 51: 11-16. 1984.

- [27] LAEVENS, H.; DELUYKER, H.; SCHUKKERN, Y.H.; DE MEULEMEESTER, L.; VANDERRMEERSCH, R.; DE MUELENAERE, E.; DE KRUIF, A. Influence of Parity and stage of lactation on the somatic cell count in bacteriologically negative dairy cows. **J. Dairy Sci.** 80: 3219-3226. 1997.
- [28] MARTIN, S.W. The evaluation of test. **Can. J. Comp. Med.** 41: 19-25. 1977.
- [29] MCDERMOTT, M.P.; ERB, H.N.; NATZKE, R.P. Predictability by somatic cell counts related to prevalence of intramammary infections within herds. **J. Dairy Sci.** 66: 1198-1203. 1982.
- [30] MEEK, A.H.; BARNUM, D.A. The application of bulk somatic cell counts to monitoring mastitis levels in dairy herds. **Can. J. Comp. Med.** 46: 7-11. 1982.
- [31] MEEK, A.H.; BARNUM, D.A.; NEWBOLD, F.H.S. Use of total and differential somatic cell counts to differentiate potentially infected from potentially non-infected quarters and cow and between herds of various levels of infection. **J. Food Protec.** 43: 10-14. 1980.
- [32] MEIJERING, A.; JAARTSVELD, F.H.J.; VERSTEGEN, M.W.A.; TIELEN, M.J.M. The cell count of milk in relation to milk yield. **J. Dairy Res.** 45: 5-14. 1978.
- [33] MILLER, R.H.; PAAPE, M.J. Relationship between milk somatic cell counts and milk yield. **Proc. 24th Ann. Mtg. Natl. Mastitis Council.** Arlington, Virginia. February 13-16: 60-72. 1985.
- [34] MURRAY, W.W.; WILLIAMSON, J.H.; HENDERSON, H.V. Changes in electrical conductivity and somatic cell count between milk fractions from quarters subclinically infected with particular mastitis pathogens. **J. Dairy Res.** 65: 187-198. 1998.
- [35] NATZKE, R.P.; EVERETT, R.W.; POSTLE, D.S. Normal milk somatic cell counts. **J. Milk Food Technol.** 35: 261-263. 1972.
- [36] PANKEY, J.W.; HOGAN, J.S.; MURDOUGH, P.A. Bacteriological monitor for mastitis. **Proc. 26th Ann. Mtg. Natl. Mastitis Council.** Orlando, Florida. February, 20-23: 10-17. 1987.
- [37] PEARSON, J.K.L.; GREER, D.O. Relationship between somatic cell counts and bacterial infections of the udder. **Vet. Rec.** 95: 252-257. 1974.
- [38] POUTREL, B.; RAINARD, P. Predicting the probability of quarter infection (by major pathogens) from somatic cell concentration. **Am. J. Vet. Res.** 43: 1296-1299. 1982.
- [39] RENEAU, J.K. Using DHI somatic cell count. **Proc. 24th Ann. Mtg. Natl. Mastitis Council.** Arlington, Virginia. February 13-16: 73-85. 1985.
- [40] RENEAU, J.K. Effective use of dairy herd improvement somatic cell counts in mastitis control. **J. Dairy Sci.** 69: 1708-1720. 1986.
- [41] RENEAU, J.K. Monitoring mastitis, milk quality and economic losses in dairy herds. **Proc. International Symposium of Bovine Mastitis.** NMC. AAVP. Indiana. September, 13-16: 326-335. 1990.
- [42] RINDSING, R.B.; RODEWALD, R.G.; SMITH, A.R.; THOMSEN, N.K.; SPAHR, S.L. Mastitis history, California mastitis test, and somatic cell counts for identifying cows for treatment in a selective dry cow therapy program. **J. Dairy Sci.** 62: 1335-1339. 1979.
- [43] SAEMAN, A.I.; VERDI, R.J.; GALTON, D.M.; BARBANO, D.M. Effect of mastitis on proteolytic activity in bovine milk. **J. Dairy Sci.** 71: 505-512. 1988.
- [44] SALSBERG, E.; MEEK, A.H.; MARTIN, S.W. Somatic cell counts: Associated factors and relationship to production. **Can. J. Comp. Med.** 48: 251-257. 1984.
- [45] SCHULTZ, L.H. Somatic cell counting of milk in production testing programs as a mastitis control technique. **J.A.V.M.A.** 170 (10), Part. 2: 1244-1246. 1977.
- [46] SHELDRAKE, R.F.; MCGREGOR, G.D.; HOARE, R.J.T. Somatic cell count, Electrical conductivity, and serum albumin concentration for detecting bovine mastitis. **J. Dairy Sci.** 66: 548-555. 1983.
- [47] SHELDRAKE, R.F.; MCGREGOR, G.D.; HOARE, R.J.T. Lactation stage, parity, and infection affecting somatic cells, electrical conductivity, and serum albumin in milk. **J. Dairy Sci.** 66: 542-547. 1983.
- [48] SHOOK, G.E. Approaches to summarizing somatic cell count which improve interpretability. **Proc. 21th Ann. Mtg. National Mastitis Council.** Louisville, Kentucky. February, 15-18: 150-166. 1982.
- [49] SMITH, C. Somatic cell counts, international marketing debated at NMC meeting. **J.A.V.M.A.** 212: 783-784. 1998.
- [50] SNEDECOR, G.W.; COCHRAN, W.G. Regression. One way classification. Analysis of Variance. Two way classification. Attribute data with more than one degree of freedom. **Statistical Methods.** (6th ed.) The Iowa State University Press. Ames, Iowa, U.S.A. 593 pp. 1973.
- [51] WILSON, C.D.; RICHARD, M.S. A survey of mastitis in the British dairy herd. **Vet. Rec.** 106: 431-435. 1980