

# AISLAMIENTO DE PATÓGENOS CAUSANTES DE MASTITIS SUBCLÍNICA EN VACAS DEL TROPICO HÚMEDO EN VERACRUZ, MÉXICO

ISOLATION OF PATHOGENS CAUSING SUBCLINICAL MASTITIS IN COWS IN THE WET TROPICS OF VERACRUZ, MEXICO

Cervantes P.<sup>1\*</sup>, Portela S.<sup>1</sup>, Hernández A.<sup>1</sup>, Domínguez B.<sup>1</sup>, Gómez-Boucrin F.<sup>1</sup>, Villagómez-Cortes J.A.S.<sup>1</sup>, Barrientos M.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Universidad Veracruzana, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Veracruz México. \*pcervantes@uv.mx.

---

**Keywords:** Somatic cells; Intramammary infections; Chromogenic medium; Creole breeds.

**Palabras clave:** Células somáticas; Infecciones intramamarias; Medio cromogénico; Razas criollas.

---

## ABSTRACT

In order to identify the pathogenic microorganisms responsible for subclinical mastitis in a tropical region, 214 cows from 6 production units were used, 4 in dual purpose systems formed of local creole breeds and 2 family dairy systems with adapted European breeds. The farms were classified by their milking practices into medium (MGP) or low (LGB) categories, and also by manual or mechanical milking. Screening was performed by the California Mastitis Test (CMT). Samples with values > 200,000 cells / ml, were cultured in selective chromogenic medium for Gram positive (G+) *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus uberis* and *Staphylococcus aureus* and Gram negative (G-), *E. coli*, *Klebsiella*, *Pseudomonas*, *Candida albicans* and *Proteus mirabilis*. The different systems and/or practices were analyzed by Kruskal-Wallis H Test and a binomial test (two-tailed) to analyze the proportion between practices ( $p < 0.05$ ). 100 % of the cows had moderate to marked mastitis. Mechanical milking was associated ( $p > 0.05$ ) with CMT values > 900 SCC/ml and manual milking with SCC > 600/ml, findings occurring in both family dairies and MGP in European breeds. The dual purpose herds, with manual milking and local creole cows were associated with LGP. The relevant frequencies of microorganisms were: G+, *S. agalactiae* (70.6 %), *S. uberis* (60.3 %) in total and in dual purpose with manual milking; *Pseudomonas* (100 %), *S. aureus* (59 %) in family dairy and mechanical milking. *Klebsiella* (49.5 %) and *E. coli* (28.5 %), the latter in dual purpose and manual milking were the most frequent G-organisms.

---

## RESUMEN

Con el objetivo de realizar la identificación primaria de microorganismos patógenos causantes de mastitis subclínica en una región del trópico, se utilizaron 214 vacas de 6 unidades de producción, 4 en sistemas de doble propósito constituidas por razas criollas locales y 2 de lechería familiar con razas europeas adaptadas, clasificadas por adopción buenas prácticas de ordeña calificadas como mediana (BPM) o baja (BPB) y de ordeña manual y mecánica. La prueba tamiz se realizó por la prueba de California Mastitis Test (CMT), a partir del resultado trazas se hizo conteo de células somáticas, valores > 200,000 células/ml, se cultivaron en medio cromogénico selectivo

para Gram positivos (G +) *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus uberis* y *Staphylococcus aureus* y Gram negativos (G -), *E. coli*, *Klebsiella*, *Pseudomona*, *Candida albicans* y *Proteus mirabilis*. Los diferentes sistemas y/o prácticas se analizaron por H de Kruskal-Wallis y la una prueba binomial (de dos colas), para analizar la proporción entre las prácticas ( $p < 0.05$ ). El 100 % de las vacas padecían mastitis; la ordeña mecánica se asoció ( $p > 0.05$ ) con CMT y cuentas  $> 900$  CCS/ml, la ordeña manual con CCS  $> 600$ /ml, ambas en lechería familiar y BPB; los hatos doble propósito, ordeña manual y vacas criollas locales se asociaron a BPB. Las frecuencias relevantes de microorganismos fueron: G+, *S. agalactiae* (70.6 %), *S. uberis* (60.3 %) en total y en doble propósito y ordeña manual; *Pseudomona* (100 %), *S. aureus* (59 %) en lechería familia y ordeña mecánica. *Klebsiella* (49.5 %) y *E. coli* (28.5 %), este último en doble propósito y ordeña manual fueron los G - más frecuentes.

---

## INTRODUCCIÓN

Entre el 20 % y 30 % de las vacas lecheras llegan a ser diagnosticados con mastitis clínica al menos una vez durante la lactancia y el costo estimado por caso de mastitis clínica cubre el rango de entre \$179 y \$488 dólares estadounidenses dependiendo de la variación de precios de la leche, el nivel de producción en vacas afectadas, las políticas de descarte y la etapa de lactancia en la que se presenta la enfermedad (Bar *et al.*, 2008; Hagnestam-Nielsen *et al.*, 2009), es un hecho que la causa más común del uso de antibióticos en los hatos lecheros es el tratamiento y la prevención de la mastitis, aunque también se han encontrado vacas con diagnóstico de la mastitis clínica causadas por hongos y algas (Erskine *et al.*, 2003; Pol & Ruegg, 2007); no obstante la inflamación de la glándula mamaria es predominante en infecciones bacterianas causadas por *Staphylococcus spp.*, *Streptococcus spp.* y coliformes, los que representan un aproximado del 90 % de los aislamientos en la leche de vacas con mastitis (Sargeant *et al.*, 1998; Riekerink *et al.*, 2008).

Cabe destacar que en los programas de control de mastitis la identificación del patógeno causal es el principal factor de éxito para la terapia antimicrobiana aplicada, de tal manera que los casos de terapia antibiótica intramamaria la velocidad de recuperación es mayor en vacas infectadas con *Staphylococcus coagulasa negativos*, *Staphylococcus spp* y *Streptococcus* ambientales (Roberson, 2012).

Sin embargo, el papel de los antimicrobianos en el tratamiento de mastitis causada por coliformes continúa como objeto de debate, debido a que en la mastitis por coliformes, los signos clínicos son causados principalmente por los lipopolisacáridos (LPS) componentes de la pared celular de las bacterias Gram negativas, considerados el factor de virulencia primario en las bacterias coliformes responsables de la mayoría de las reacciones fisiopatológicas en la mastitis por *E. coli* (Soujaja *et al.*, 2013). En situaciones prácticas, la mastitis aguda de *E. coli* suele detectarse en base a signos clínicos, en el momento que los conteos de bacterias en la leche ya son altos y no se puede prevenir un daño considerable en los tejidos. Es por ello que en los hatos lecheros la identificación rápida de los agentes patógenos de la leche es fundamental para la terapia antimicrobiana específica, lo que ayuda a evitar el uso indiscriminado de antibióticos en el ganado y reduce la carga económica de la mastitis clínica (Lago *et al.*, 2011). El uso de medios de cultivo cromogénico para la identificación de bacterias Gram negativas y Gram positivas en la leche con mastitis, asociado al estudio de la secuenciación del gen 16S rRNA, permitieron reconocer que el medio cromogénico posee un enfoque único para la identificación de patógenos causantes de mastitis en las explotaciones lecheras, presentan una sensibilidad y especificidad del 82.3 % y 89.9 %, respectivamente (Ganda *et al.*, 2016).

La importancia de la mastitis tanto por razones de salud humana como animal y los costos que este padecimiento representa en la economía de cualquier modelo de producción afectado, justifican el estudio de los diferentes procedimientos para la pronta y acertada identificación en la glándula mamaria que sufre de una patología subclínica o clínica (Avila & Romero, 2010).

### MATERIAL Y MÉTODOS

De una población estimada 419 vacas en 6 unidades de producción (UP), cuatro UP (1, 2, 3 y 4) están constituidas por vacas de razas criollas locales en sistema de doble propósito (DP) en la zona centro costa y dos hatos de razas especializadas en la zona centro, ambos del estado de Veracruz, México. UP1 es un hato de 100 vacas de razas criollas locales con 26 vacas en ordeña, cuenta con sistema de ordeña mecánico y realizan prácticas de lavado, secado y sellado; en la UP2 el hato se conforma de 45 vacas criollas, 23 de ellas en ordeña; UP3 está conformada de 100 vacas criollas con 59 en ordeña; la UP4 está formada por 40 vacas, 21 en ordeña. El sistema DP de las UP 1, 2, 3 y 4, producen leche y carne, con pastoreo rotacional en la UP1 y pastoreo libre en las UP2, UP3 y UP4, en estas 3 últimas el ordeño es manual y no se realizan buenas prácticas de ordeño. La UP5, consta de 54 vacas lecheras de la de raza Holstein y con 46 en ordeña, mientras la UP6 está conformada de 80 vacas de razas Suizo Europeo, 39 vacas en ordeña. UP5 y UP6, se consideran de lechería familiar dedicada sólo a la producción láctea, la alimentación se realiza en sistema de pastoreo rotacional y adición de alimento concentrado a la hora del ordeño; en ambas el sistema de ordeño es mecánico; como práctica sanitaria en la UP5 se realiza lavado de ubre y en la UP6 lavado y secado de la ubre. Se utilizaron muestras de leche provenientes de los cuartos mamarios de las 214 vacas en ordeña. La prueba tamiz para identificar vacas positivas a mastitis fue la Prueba de California (CMT), al pie de la vaca. El criterio para clasificar a los positivos fue a partir de trazas (T), 1, 2 y 3 (tabla I).

**Tabla I.** Escala de CMT: relación entre los resultados CCS y de CMT (*CMT scale:relation between CCS and CMT results*).

Escala de CMT	Rangos de células somáticas	Formación de gel
Negativo	0.0 - 200,000	Negativo
Trazas	200,000 - 1,200,000	Muy leve
1	400,000 - 1,200.000	Leve
2	1,200,000 - 5,000,000	Moderada
3	> 5,000,000	Importante, casi se solidifica

Tomado de: Wolter *et al.* (2004).

Cada vaca con valor mayor a trazas, se consideró positiva y se continuó con la toma aséptica de la muestra de acuerdo a los procedimientos estándar de la Federación Internacional de Lechería (FIL-IDF 50B, 1995), que incluyó limpieza y desinfección de la glándula mamaria y pezones, con muestreo de leche de cada cuarto para prueba de CMT y en bolsas estériles con un volumen aproximado de 15 ml de leche refrigerado (4°C) hasta el conteo de células somáticas y cultivo microbiológico (Wolter *et al.*, 2004). El conteo de células somáticas (CCS), fue con el contador electrónico automático infrarrojo DCC (DeLaval® Cell Counter), por citometría de escaneo laser (480 nm), con ADN celular marcado en el fluorocromo Yoduro de propidio (C<sub>27</sub>H<sub>34</sub>I<sub>2</sub>N<sub>4</sub>). Las muestras con cuentas > 200,000 CCS/ml se consideraron como positivas para proseguir al cultivo microbiológico. El cultivo microbiológico fue en medio cromogénico selectivo (CHROMagar™ Mastitis) para Gram positivos (G+) *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus uberis* y

*Staphylococcus aureus* y Gram negativos (G-), *E. coli*, *Klebsiella*, *Pseudomona*, *Candida albicans* y *Proteus mirabilis*. Se realizó siembra directa por estrías en cada placa, se incubó en condición aerobia a 37 °C entre 18 y 24 horas. La identificación de los patógenos fue de acuerdo al tipo y coloración de colonias: Gram +: *Streptococcus agalactiae* = azul turquesa, *Streptococcus uberis* = azul metálico y *Staphylococcus aureus* = rosa; bacterias Gram negativas = inhibidas. Las Gram-: *E. coli* = rosa oscuro a rojizo; *Klebsiella sp.*, *Enterobacter*, *Citrobacter* = azul metálico (+/- halo rojizo); *Proteus sp.*, halo marrón; *Pseudomona* = Translúcidas (+/- pigmentación natural de crema a verde); *C. albicans* = crema, colonias puntiformes, opacas y pequeñas; las bacterias Gram positivas = inhibidas. Los porcentajes los resultados de las pruebas CMT y CCS, se asociaron con las variables de manejo que caracterizaban a cada una de las UP consideradas para este estudio, se consideraron las variables: A) práctica de ordeño (manual o mecánica), B) el tipo de lechería (familiar o doble propósito), C) el grupo genético (Raza) predominante en la UP (Europea o cruce de Europea x Cebú), así como, D) la calificación a las buenas prácticas de producción de leche (Buena, Regular y Baja); cabe señalar que para esta última calificación, solo fue posible distinguir las opciones regular y baja. Se realizó el análisis estadístico de las diferentes variables de manejo por el método no paramétrico del Kruskal Wallis y la prueba binomial (de dos colas) para analizar la proporción entre las prácticas ( $P < 0.05$ ).

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

De acuerdo al manejo, la ordeña mecánica se asoció significativamente ( $P > 0.05$ ) con la prueba CMT nivel 1 ( $> 900$  CCS); mientras que en ordeña manual la asociación fue con CCS  $> 600$ , ambas asociaciones fueron en UP de Lechería Familiar y Unidades de Producción con nivel Bajo de Buenas Prácticas y razas europeas, así como en las unidades de producción de doble propósito y con ordeña manual, vacas de cruzamientos *Bos taurus* x *Bos indicus* con nivel Bajo de Buenas Prácticas.

En las tablas II y III se muestran en porcentajes los resultados de las pruebas CMT y CCS, respectivamente, de acuerdo a la asociación existente entre las características de manejo que definieron a cada una de las UP. En el caso de la prueba CMT, en general se observa que la mayoría de los casos positivos, se diagnosticaron como “sospechosos”, a los cuales se le asignó la calificación 0.5, en tanto que los casos positivos, reconocidos como 1, 2, 3 y 4, fue posible reconocer un descenso de dicho porcentaje de afectación en la medida que aumento la severidad de la respuesta de la prueba. Estos resultados sugieren que, en los hatos de ganadería de doble propósito con baja calificación en la adopción de Buenas Prácticas de Manejo, son las que demuestran una mayor afectación de mastitis subclínica, lo que confirma que la prueba se mostró como útil para contar con un primer reconocimiento de la presencia de mastitis en todas las UP estudiadas. En tanto que la determinación de la frecuencia de mastitis subclínica consideradas por medio del CCS (tabla III), al evaluar su asociación con las características propias del manejo de cada una de las UP contempladas como importantes en este estudio, confirman lo observado en la prueba de CMT, sin embargo, aunque es posible distinguir la mayor sensibilidad de la prueba, lo que permitiría un mejor manejo de estos casos, siguen siendo las condiciones de manejo de la ganadería de doble propósito donde se reconoce una mayor afectación.

Los valores encontrados de CCS asociado al cultivo microbiológico demostraron que del 100 % de los animales analizados presentan mastitis subclínica con infecciones mixtas de moderadas a altas y CCS  $> 200,000$ , resultado que se asocia a CMT trazas y en consecuencia presencia de la enfermedad (Ruiz *et al.*, 2011). De los patógenos identificados, las frecuencias más relevantes

fueron de G+, *S. agalactie* (70.6 %), *S. uberis* (60.3 %) en total y en doble propósito con ordeña manual con razas de cruza *Bos taurus* x *Bos indicus*; mientras que en ordeña mecánica predominó *S. aureus* (59 %) *S. agalactie* (50 %), *S. uberis* (65 %) en lechería familiar. Dada la característica común de *S. aureus*, *Str. agalactiae*, que es colonizar y crecer en la piel de la ubre y dentro del canal del pezón (Saran y Shaffer, 2000), son considerados infecciosos tanto en forma individual como en una población y pueden ser controlados en los hatos lecheros a través del uso de buenas prácticas de manejo, en el que se debe incluir la desinfección de los pezones después de la ordeña, terapia de la vaca seca, desecho, mantenimiento del equipo de ordeño, y terapia antibiótica de las infecciones intramamarias (Bedolla y de León, 2008).

**Tabla II.** Frecuencia de mastitis subclínicas en vacas de trópico empleando la prueba California (CMT), según tipo de ordeña, propósito, manejo y raza (*Frequency of subclinical mastitis in tropic cows using the California test (CMT), according to type of milking, purpose, management and breed*).

	n	CMT 0.5	CMT 1	CMT 2	CMT 3	CMT 4
Ordeña Mecánica	111	29.11 %	7.51 %	9.39 %	5.63 %	0.47 %
Ordeña Manual	103	28.64 %	9.39 %	9.86 %	0.00 %	0.00 %
Raza Criolla Local (DP)	129	37.85 %	10.75 %	11.68 %	0.00 %	0.00 %
Raza Holstein (Lechería Familiar)	46	20.09 %	6.07 %	7.48 %	5.61 %	0.47 %
Raza Suizo (Lechería Familiar)	39	20.09 %	6.07 %	7.48 %	5.61 %	0.47 %
BP regular	111	20.09 %	4.67 %	3.75 %	1.87 %	0.00 %
BP mala	103	37.85 %	12.15 %	15.42 %	3.74 %	0.47 %

n = total de vacas analizadas.

**Tabla III.** Frecuencia de mastitis subclínica en vacas de trópico empleando conteo de células somáticas (CCS), según tipo de ordeña, propósito, manejo y raza. (*Frequency of subclinical mastitis in tropic cows using somatic cell counts (CCS), according to type of milking, purpose, management and breed*).

	n	CCS 1	CCS 2	CCS 3	CCS 4
Ordeña Mecánica	111	28.64 %	6.67 %	6.10 %	10.80 %
Ordeña Manual	103	32.86 %	8.45 %	3.76 %	2.89 %
Raza Criolla Local (DP)	129	42.06 %	3.27 %	5.61 %	9.35 %
Holstein (Lechería Familiar)	46	19.63 %	10.28 %	4.21 %	5.61 %
Suizo (Lechería Familiar)	39	19.63 %	10.28 %	4.21 %	5.61 %

n = total de vacas analizadas

Los porcentajes de los G-, *Klebsiella* (49.5 %), y *E. coli* (28.5 %), fueron mayores en los hatos doble propósito y ordeña manual, las bacterias coliformes son causa muy frecuentes de mastitis clínica, aún en hatos bien manejados y con bajos conteos de células somáticas, aunque otras especies como *Klebsiella* spp también son comunes (Riekerink *et al.*, 2008). De los resultados de *C. albicans* fue baja su presencia, pero su importancia radica en que el factor de virulencia B1 (PLB1), secretado por *Candida*, es una enzima que digiere los componentes fosfolipídicos de la membrana de la célula huésped que conduce a la lisis celular con alteraciones de las características superficiales que facilitan la adherencia y la infección (Eldesouky *et al.*, 2016) y

aún con baja cantidad de animales infectados, se deben tomar medidas para evitarla, ya que su presencia se asocia zoonosis, y representa un factor que compromete la calidad y seguridad de los derivados lácteos como el queso (Sartori *et al.*, 2014). En el caso de *Pseudomona* en 3 hatos se encontró hasta el 100 % de crecimiento, este se considera un agente infeccioso de aparición esporádica y relacionado a falta de higiene durante la ordeña, principalmente al agua utilizada en las instalaciones de ordeño de origen no potable y existe fuerte asociación entre la calidad bacteriológica del agua y la presencia de *Pseudomonas* spp. (Yera Pompa & Ramírez, 2016; Kawai *et al.*, 2017).

## CONCLUSIONES

La distribución de los patógenos de la mastitis dependió del sistema de ordeño, siempre con mayor cantidad en ordeño a manual. Las buenas prácticas de ordeña, tanto en ordeña manual como mecánica, llevan a mejorar el rendimiento y la salud de los hatos, al reducir la exposición de las vacas a los patógenos tanto ambientales como infecciosos e incidir en las terapias adecuadas que reduzcan esta enfermedad, a través de las diversas tecnologías disponibles para su diagnóstico y prevención. El desafío que imponen los factores ambientales en los bovinos productores de leche en la región tropical resulta mayor en los grupos raciales *Bos taurus* con respecto a las razas criollas locales, debido a que los últimos muestran mayor capacidad de adaptación a las condiciones que prevalecen en un clima cálido y húmedo, sin embargo, el problema de mastitis está asociado a malas prácticas de ordeña que conducen a que al menos un tercio de las vacas de estas razas estén afectadas por cualquier forma de mastitis en uno o más cuartos.

## BIBLIOGRAFÍA

- Bar D., Tauer L.W., Bennett G., Gonzalez R.N., Hertl J.A., Schukken YH., Schulte HF., Welcome FL. & Gröhn YT, 2008. The cost of generic clinical mastitis in dairy cows as estimated by using dynamic programming. *J Dairy Sci* 91 (6):2205–14.
- Bedolla C.C. & de León M.P. 2008. Pérdidas económicas ocasionadas por la mastitis bovina en la industria lechera. *REDVET. Revista electrónica de Veterinaria*, 9(4), 1-26.
- Eldesouky I., Mohamed N., Khalaf D., Salama A., Elsify A., Ombarak, R., & Effat M. 2016. Candida Mastitis in Dairy Cattle with Molecular Detection of *Candida albicans*. *Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 22(3), 461-464.
- Erskine R.J, Wagner S.A., & DeGraves F.J. 2003. Mastitis therapy and pharmacology. *Vet Clin North Am Food Anim Pract.* 19:109–38.
- Ganda, E.K., Bisinotto, R.S., Decker, D.H. & Bicalho, R.C. 2016. Evaluation of an on-farm culture system (Accumast) for fast identification of milk pathogens associated with clinical mastitis in dairy cows. *PloS one*, 11(5), e0155314.
- Hagnestam-Nielsen C. & Ostergaard S. 2009. Economic impact of clinical mastitis in a dairy herd assessed by stochastic simulation using different methods to model yield losses. *Animal*. 3:315–28.
- International Dairy Federation FIL/IDF, 1995. Milk and milk products. Methods of sampling. FIL/IDF 50B. Brussels, Belgium.
- Kawai K., Shinozuka Y., Uchida I., Hirose K., Mitamura T., Watanabe A. & Nagahata H. 2017. Control of *Pseudomonas* mastitis on a large dairy farm by using slightly acidic electrolyzed water. *Animal Science Journal* (doi: 10.1111/asj.12815).

- Lago A, Godden SM, Bey R, Ruegg PL, & Leslie K. 2011. The selective treatment of clinical mastitis based on on-farm culture results: I. Effects on antibiotic use, milk withholding time, and short-term clinical and bacteriological outcomes. *J Dairy Sci* 94(9):4441–56. doi: 10.3168/jds.2010-4046.
- Pol M, & Ruegg P.L. 2007. Treatment practices and quantification of antimicrobial drug usage in conventional and organic dairy farms in Wisconsin. *J Dairy Sci* 90(1):249–61.
- Riekerink R.O., Barkema H.W., Kelton D.F. & Scholl, D.T. 2008. Incidence rate of clinical mastitis on Canadian dairy farms. *J Dairy Sci* 91(4), 1366-1377.
- Roberson J.R. 2012. Treatment of clinical mastitis. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice* 28 (2):271–88.
- Ruiz A., Ponce P., Gomes G., Mota R., Sampaio E., Lucena E., & Benone S. 2011. Prevalencia de mastitis bovina subclínica y microorganismos asociados: comparación entre ordeño manual y mecánico en Pernambuco, Brasil. *Rev Salud Anim* 33: 57-64.
- Saran A. & Shaffer M. 2000. Mastitis y Calidad de la leche. Ed. Intermédica. Buenos Aires, Argentina, 194 pp.
- Sargeant J.M., Scott HM, Leslie KE., Ireland MJ. & Bashiri A. 1998. Clinical mastitis in dairy cattle in Ontario: frequency of occurrence and bacteriological isolates. *Canadian Veterinary Journal* 39(1):33–8.
- Sartori L.C.A., Santos R.C. & Marin, J. M. 2014. Identification of *Candida* species isolated from cows suffering mastitis in four Brazilian states. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, 66(5), 1615-1617.
- Suojala L., Kaartinen L. & Pyorala S. 2013. Treatment for bovine *Escherichia coli* mastitis – an evidence-based approach. *Vet. Pharm. Ther.* 36:521-531.
- Wolter W., Hugo C., Bärbel K. & Michael Z. 2004. Anatomía de la glándula mamaria y fisiología de la lactación. En Mastitis bovina. Editorial Universitaria, México. Pp143.
- Yera Pompa G. & Ramírez, W. 2016. La Prevalencia de mastitis clínica en vacas mestizas Holstein x Cebú. *REDVET. Revista Electrónica de Veterinaria*, 17(3).