



Miguel Hernández

UNIVERSIDAD MIGUEL HERNÁNDEZ DE ELCHE

Departamento de Tecnología Agroalimentaria



Estudio de la conductividad eléctrica de la leche de oveja Manchega como método de detección de mamitis.

M^a Amparo Roca Gumbau.
Orihuela, Septiembre 2017.

ESTUDIO DE LA CONDUCTIVIDAD ELÉCTRICA DE LA LECHE DE OVEJA MANCHEGA COMO MÉTODO DE DETECCIÓN DE MAMITIS.



UNIVERSIDAD MIGUEL HERNÁNDEZ DE ELCHE
ESCUELA POLITÉCNICA SUPERIOR DE ORIHUELA
DEPARTAMENTO DE TECNOLOGÍA AGROALIMENTARIA

TESIS DOCTORAL presentada por
M^a Amparo Roca Gumbau bajo la dirección de
Gema Romero Moraleda y José Ramón Díaz Sánchez del
Departamento de Tecnología Agroalimentaria, para optar al
grado de Doctora Ingeniera Agrónoma.

Orihuela, Septiembre de 2017.

UNIVERSIDAD MIGUEL HERNÁNDEZ.

UNIVERSIDAD MIGUEL HERNÁNDEZ

DEPARTAMENTO DE TECNOLOGÍA AGROALIMENTARIA



**Estudio de la conductividad eléctrica de la
leche de oveja Manchega como método de
detección de mamitis.**

Vº Bº

Vº Bº

Gema Romero Moraleda

José Ramón Díaz Sánchez

Orihuela, Septiembre de 2017.

UNIVERSIDAD MIGUEL HERNÁNDEZ



Dr. José Ramón Díaz Sánchez, Dr. Ingeniero Agrónomo, Catedrático de Universidad y Director del Departamento de Tecnología Agroalimentaria de la Universidad Miguel Hernández,

INFORMA:

Que atendiendo al informe presentado por los Dres. Gema Romero Moraleda, profesora Contratada Doctora y José Ramón Díaz Sánchez, Catedrático de Universidad, ambos del Departamento de Tecnología Agroalimentaria, la Tesis Doctoral titulada “Estudio de la conductividad eléctrica de la leche de oveja Manchega como método de detección de mamitis” de la que es autora la Ingeniera Agrónoma y Suficiencia Investigadora D^a Amparo Roca Gumbau ha sido realizada bajo la dirección de los Dres. citados, puede ser presentada para su correspondiente exposición pública.

Y para que conste a los efectos oportunos firmo el presente informe en Orihuela a _____de_____de 2017.

Fdo.: Dr. José Ramón Díaz Sánchez

Agradecimientos

Esta Tesis es el resultado del esfuerzo realizado por un gran equipo de profesionales que me han acompañado desde el inicio de este largo camino. Y por fin, llegó el momento: Aquí está nuestra Tesis, Gracias!!!

En primer lugar quisiera agradecerles a mis directores, Gema y Jose Ramón, el haberme dado la oportunidad de iniciarme con ellos en mi carrera investigadora. Gracias por no permitirme abandonar, y porque a pesar de todo, habéis seguido apoyándome y facilitándome el camino para lograr la finalización de esta Tesis.

A las entidades que han financiado parte de los estudios: Ministerio de Educación y Ciencia (Proyecto AGL2006-06939)

A Cristófol Peris Ribera, Vidal Montoro Angulo y Ramón Arias Sánchez por colaborar en la revisión externa previa al depósito de Tesis.

A todos los compañeros y alumnos (Gema, Jose Ramón, Manuel, Raquel, Diego, M José, Antonio, Begoña, Borja, Juan, Bea) que aportaron su granito de arena, en esas largas sesiones de toma de muestras, “peleando” con las “borregas” y posteriormente hicieron más amenas las tardes en el laboratorio. A Andrés, que aguantó como un campeón en el mundillo de la producción animal.

A los técnicos de laboratorio que me echaron una mano en el procesado de muestras, Antonio Zafra, Javier y especialmente a Juanmi. A Raquel, por su inestimable ayuda y sus consejos al inicio de este camino, por las largas tardes en el laboratorio y las meriendas en “ca la Toñi”.

A mis compañeros de granja:

A Ana y Alberto, que me acompañaron en mis inicios, haciendo con sus risas que los días en la granja fueran más llevaderos.

A Manuel, por formarme. Por “obligarme” a pensar y sus valiosos consejos. Por su ayuda, ya no durante la realización de los controles, si no en el día a día, encargándose de que los animales fueran ordeñados correctamente y vigilando en todo momento que estuvieran en óptimas condiciones.

Alfonso y Elena, por su apoyo en la etapa final de la realización de esta Tesis. Por entenderme y animarme cuando he estado a punto de tirar la toalla. Elena, por esa paciencia infinita, soportando mis historias, quejas y desvaríos. Gracias chicos.

Gracias a todos los que habéis llegado en los últimos años (Desi, Darío). A Paula, por su compañerismo y su buen humor.

A esos grandes amigos que se han convertido en mi familia en estos años en la Vega Baja. Al “desocupao”, a Quino, por sus “dejad que me aburra”.

A David, por tu sana amistad, por todas nuestras aventuras, por tu apoyo incondicional, por hacerme sentir parte de tu familia, gracias a tí, a tus padres, al Tío Juan, a Ivan...

Y en último lugar, a mi familia, especialmente a mi madre, por creer siempre en mí. Gràcies mami!!



RESUMEN.

El objetivo general de la presente Tesis Doctoral es el estudio del uso de la conductividad eléctrica de la leche (CE) como método automático de detección de mamitis durante el ordeño mecánico de ovejas de raza Manchega. Para ello se han diseñado dos Ensayos con el fin de conseguir los siguientes objetivos específicos:

1. Estudiar el efecto de distintos factores no infecciosos (estado de lactación, número de parto, sesión de ordeño y fracción de ordeño) e infecciosos (estado sanitario de las glándula mamaria) en la lectura de la CE de la leche (Ensayo 1).
2. Estudiar el empleo de umbrales absolutos de CE para discriminar el estado sanitario de las glándulas mamarias (Ensayo 1).
3. Estudiar el efecto de la instauración de la infección intramamaria en la CE de la leche glandular y su evolución en el tiempo siguiente a la infección (Ensayo 2).
4. Evaluar la capacidad de detección de mamitis de diversos algoritmos basados en la medida diaria de la CE de la leche glandular utilizando un conductímetro de laboratorio y un prototipo diseñado para la lectura automática diaria de la CE de la leche a nivel de glándula mamaria durante el ordeño mecánico (Ensayo 2).

En el Ensayo 1 se realizaron dos Experimentos en los que se estudió el efecto de distintos factores no infecciosos e infecciosos en la lectura de la CE de la leche y el empleo de umbrales absolutos de CE para discriminar el estado sanitario de las glándulas mamarias (Objetivos 1 y 2). En el Experimento 1, se estudió el efecto del estado sanitario de las glándulas y de diversos factores no infecciosos (estado de lactación, sesión de ordeño: mañana o tarde y número de lactación) que afectan al empleo de la CE de la leche como método de detección de mamitis en ganado ovino lechero. Así mismo, también se estudió la relación de la CE con la composición de la leche (macrocomposición y contenido mineral) y la relación existente entre la CE y el recuento de células somáticas (RCS). Finalmente, se evaluó el uso de umbrales de CE como método de detección de mamitis. Para ello, se realizó un seguimiento de la CE de la leche glandular a lo largo de dos lactaciones consecutivas durante las que se controlaron 42 y 43 ovejas, respectivamente. Se realizaron 7 controles quincenales en los que se analizó la CE, el RCS, la composición y el contenido mineral de la leche glandular en el ordeño matutino y vespertino. Antes del ordeño de la mañana, se tomaron muestras asépticamente para

realizar un análisis bacteriológico, cuyos resultados junto con el RCS se utilizaron para la clasificación de las glándulas de acuerdo a su estado sanitario (sanas, con infección latente o infectadas).

El estado de lactación (mayores valores de CE al inicio y final de lactación que en la mitad de la lactación), el número de lactación (mayor CE en las multíparas que en las primíparas), la sesión de ordeño (mayor CE en la mañana que en la tarde), el estado sanitario (mayor CE en las glándulas con mamitis infecciosa que en las sanas y con mamitis latente) tuvieron un efecto significativo en la CE y en el RCS de la leche.

La CE de las ovejas multíparas fue significativamente superior a la registrada en las ovejas primíparas; esta diferencia se observó en ambos ordeños, independientemente del estado de lactación o el estado sanitario de las glándulas.

De forma general, la CE no se mantuvo constante en toda la lactación. El valor máximo de CE se registró en el primer control (a las dos semanas del parto), observándose un descenso significativo entre la segunda y cuarta semana de lactación. A partir de la cuarta semana, la CE descendió paulativamente hasta alcanzar el valor mínimo en la décima semana, aunque ya no se observaron diferencias significativas entre controles sucesivos. En las cuatro últimas semanas del experimento, la CE se incrementó, pero sin llegar a alcanzar los valores registrados al inicio de la lactación.

La correlación de la CE con el RCS solo fue significativo al analizar todos los datos en conjunto ($r = 0,33$) y para $RCS \geq 600.000$ cel/mL ($r = 0,25$). Los cambios en el contenido graso de la leche, explican en gran medida la variación de la CE ($R^2_{\text{parcial}} = 0,24$). También se observó, que para un mismo umbral absoluto de CE, la especificidad (Sp) y la sensibilidad (Se) variaron en función del número de parto o de la sesión de ordeño. El punto en el que se registró la mejor combinación de Se y Sp fue al aplicar un umbral de 4,3 mS/cm en las ovejas primíparas (Se = 63,64% y Sp = 63,31%), pero al aplicar este mismo umbral de forma general, aunque se obtuvo una Sp ligeramente superior (64,67%) la Se disminuyó al 49,57%. En todos los casos se registró un bajo valor predictivo positivo (VPP). El valor máximo se registró en ovejas multíparas al aplicar un umbral de 5 mS/cm, pero con este umbral solo se obtuvo una Se = 18,96%. En cambio, el valor predictivo negativo (VPN) no fue en ningún momento inferior al 80%.

En el Experimento 2, se estudió el efecto de la fracción de ordeño y el estado sanitario de las glándulas en la CE de la leche, así como la relación de la CE con la composición de la leche y la relación entre la CE y el RCS. Finalmente, al igual que en el

Experimento 1, se evaluó el uso de umbrales absolutos de CE como método de detección de mamitis en las distintas fracciones de ordeño. Para ello, se realizó un único control en el que se analizó la CE, macro-composición de la leche y RCS de 178 glándulas de ovejas de raza Manchega en tres fracciones de ordeño: primeros 100 mL (F1); leche máquina (F2); leche de apurado (F3). Para la clasificación de las glándulas según su estado sanitario, se realizaron tres controles bacteriológicos (una semana antes, el día de toma de muestras y una semana después) en los que se recogieron muestras asépticamente antes del ordeño de la mañana para su posterior siembra y análisis bacteriológico.

La fracción de ordeño, el estado sanitario de las glándulas y el número de parto de las ovejas tuvieron un efecto significativo en la CE y el RCS. La interacción del estado sanitario con la fracción de ordeño solo mostró un efecto significativo en el RCS.

La CE registrada en F1 fue superior a la registrada en F2, y esta a su vez superior a la registrada en F3. Al clasificar las glándulas en función del estado sanitario, aunque se observó un descenso de la CE a medida que transcurría el ordeño, no se observaron diferencias significativas entre F2 y F3 en las glándulas mamíticas.

La correlación de la CE con el RCS, aunque moderada, fue significativa en las tres fracciones de ordeño. Los cambios en el contenido en grasa y lactosa en la leche, explicaron en gran medida la variación de la CE ($R^2_{\text{parcial}} = 0,45$ y $0,30$ respectivamente), observándose una relación negativa entre ambas variables y la CE de la leche.

Para un mismo umbral de CE, la Sp y Se variaron ligeramente en función de la fracción de ordeño. El punto corte de ambas curvas, se dio para un umbral de 4,2, 4,1 y 4,0 mS/cm en la F1, F2 y F3 respectivamente, obteniendo en las tres fracciones valores de Se y Sp inferiores al 55%. El VPP se mantuvo en torno al 20% para umbrales inferiores a 4,4 mS/cm. Al incrementarse el umbral por encima de 4,4 mS/cm se mejoraba el VPP del método, pero se producía una pérdida de Se. El VPN se mantuvo por encima del 80% para todos los umbrales propuestos.

En el Ensayo 2, se realizó un experimento con el fin de estudiar el efecto de la instauración de la infección intramamaria en la CE, el RCS y la producción de las glándulas y su evolución en el tiempo siguiente a la infección. También se evaluó la capacidad de detección de mamitis de diversos algoritmos basados en la medida diaria de la CE de la leche glandular utilizando un conductímetro de laboratorio y un prototipo diseñado para la lectura automática diaria de la CE de la leche a nivel de glándula mamaria durante el ordeño mecánico. Para ello se realizó un seguimiento diario en los dos ordeños

(mañana y tarde) de la CE y de la producción de las glándulas de 26 ovejas libres de infección intramamaria durante 3,5 semanas. Tras este periodo, se simularon varias situaciones desfavorables para el estado sanitario de las glándulas mamarias (SDS) que pueden darse en explotaciones comerciales, evaluando el estado sanitario de las glándulas durante ese periodo. Las SDS se prolongaron hasta que se tuvo un número suficiente de glándulas infectadas, tras lo cual, el experimento se prolongó durante 3,5 semanas durante las que se realizó un seguimiento diario de la evolución de la CE y la producción y se continuaron realizando análisis bacteriológicos y midiendo el RCS. Las muestras de leche para determinar su composición se tomaron el día de inicio de las SDS y transcurridos 4, 7, 11, 18, 21 y 28 días de la instauración de la infección. Con los valores registrados de CE (con el conductímetro de laboratorio y con el prototipo) en ambos ordeños, se estudió el comportamiento de distintos algoritmos de cálculo basados en detectar desviaciones sobre el historial de la CE en ordeños consecutivos.

El establecimiento de la infección intramamaria produjo un incremento del RCS y una disminución significativa de la producción, más acusada en ovejas infectadas bilateralmente que unilateralmente. La CE tras la instauración de la infección solo se elevó de forma significativa cuando la infección se produjo de forma bilateral.

Con las medidas diarias de CE se aplicaron varios algoritmos basados en la detección de variaciones anómalas de la CE de la glándula individual y en variaciones de la RELCE (Relación de CE entre glándulas colaterales), observándose mejores resultados al utilizar las segundas.

Los mejores resultados ($Se = 91,7\%$; $Sp = 90,9\%$; $VPP = 91,7\%$ y $VPN = 90,9\%$) se obtuvieron al aplicar una regla basada en la detección de una desviación de la RELCE de tres veces la desviación típica con respecto a la media de RELCE de los registros tomados durante los 10 días anteriores ($|RELCE - RELCE_{med(10 \text{ días})}| > 3 \sigma_{(10 \text{ días})}$), al tener en cuenta el conjunto de los 5 días posteriores a la instauración de la infección. Con los datos registrados por el prototipo también se obtuvieron altas Se y Sp , pero los VPP y VPN fueron inferiores, atribuyéndose a la descalibración del equipo observada a lo largo del experimento. Por ello, se recomienda que en el desarrollo de equipos para la medida on-line de la CE se integren métodos de autocalibración.

En este experimento, los cambios registrados en la CE se explicaron en gran medida por la variación del contenido en lactosa ($R^2_{parcial} = 0,43$). En cuanto a la correlación entre la CE y el RCS, fue significativa pero moderada en ambos ordeños, obteniéndose mayor

coeficiente de correlación cuando el RCS > 400.000 cel/mL y en el ordeño de la tarde respecto al ordeño de la mañana.

A partir de los resultados obtenidos se puede concluir que la CE de la leche en ganado ovino Manchego está muy relacionada con la composición de la leche, por lo que puede ser utilizada como método de detección de mamitis siempre y cuando la infección llegue a provocar daños en la glándula mamaria capaces de alterar la composición de la leche. También hay otros factores no infecciosos que afectan a la CE de la leche: el estado de lactación, el número de lactación, el tipo de ordeño (mañana o tarde) o la fracción de ordeño, por lo que no es recomendable el uso de umbrales absolutos de CE para la detección de mamitis. El uso de algoritmos de cálculo basados en la comparación de la CE con medidas previas diarias de la CE de una misma glándula que permitan detectar variaciones anómalas de la variable ha obtenido resultados satisfactorios para la detección de mamitis. Para una correcta medida de la CE “on-line”, serían necesarios más estudios enfocados al diseño de sensores de menor tamaño que puedan ser integrados en el tubo corto de leche o en la pezonera, dotados de un sistema de autocalibración, cuidando en todo momento que su fabricación sea a base de materiales autorizados para su uso en la industria agroalimentaria y que no se vean afectados por los detergentes utilizados en el lavado diario de las máquinas de ordeño.

SUMMARY

The general aim of this doctoral thesis was to study the use of the electric conductivity of milk (EC) as an automatic method of detecting mastitis during machine milking of Manchega breed sheep. To this end, two assays were designed to achieve the following specific objectives:

1. To study the effect of different non-infectious (lactation status, partum number, milking session and milking fraction) and infectious (mammary gland health status) factors in milk EC readings (Assay 1).
2. To study the use of absolute EC thresholds to distinguish the health status of mammary glands (Assay 1).
3. To study the effect of the onset of intramammary infection in the EC of glandular milk and its evolution over time following infection (Assay 2).
4. To assess the mastitis detection potential of several algorithms based on daily measurement of the EC of glandular milk, using a laboratory conductivity meter and a prototype designed for daily automatic reading of milk EC at mammary gland level during mechanical milking (Assay 2).

In assay 1, two experiments were carried out to examine the effect of different infectious and non-infectious factors on milk EC readings and the use of absolute EC thresholds to distinguish the health status of mammary glands (Objectives 1 and 2). In experiment 1, we studied the effect of the health status of the glands and of various non-infective factors (lactation stage, milking session: morning or evening and lactation number) on the application of milk EC as a mastitis detection method in dairy sheep. Likewise, we also studied the relation between EC and milk composition (macro-composition and mineral content) and between EC and somatic cell counts (SCC). Finally, we evaluated the use of EC thresholds as a mastitis detection method. To this end, we monitored the glandular milk EC throughout two consecutive lactations, during which 42 and 43 ewes were controlled, respectively. Seven fortnightly checks were carried out, analysing the EC, SCC, composition and mineral content of glandular milk at morning and evening milkings. Before the morning milking, samples were taken aseptically for bacteriological analysis, whose results along with the SCC were used to classify the glands according to their sanitary status (healthy, latently infected or infected).

The lactation stage (higher EC values at the onset and end of lactation than halfway through), lactation number (higher EC in multiparous than in primiparous ewes), milking session (higher EC in the morning than in the afternoon) and health status (greater EC in the glands with infectious mastitis than in healthy ones and those with latent mastitis) all had a significant effect on the EC and SCC of the milk.

EC of multiparous ewes was significantly higher than that recorded in primiparous ewes; this difference was observed in both milkings, regardless of lactation stage or health status of the glands.

In general, the EC did not remain constant throughout lactation. The maximum EC value was recorded at the first control (two weeks post-partum), followed by a significant falloff between the second and fourth weeks of lactation. As of week four, the EC gradually dwindled until reaching the minimum value in the tenth week, although no further significant differences were observed between successive controls. In the last four weeks of the experiment, the EC increased, but failed to reach the values recorded at the onset of lactation.

The correlation between EC and SCC was only significant when all the data were analysed ($r=0.33$) and for $SCC \geq 600.000$ cells/mL. The changes in milk fat content largely explain the variation in EC ($R^2_{\text{partial}}=0.24$). We also observed that, for the same EC threshold, the specificity (Sp) and sensitivity (Se) vary depending on the partum number or milking session. The point at which the best combination of Se and Sp was recorded was when applying a threshold of 4.3 mS/cm in the primiparous ewes (Se=63.64% and Sp=63.31%), but when applying this same threshold overall, even though a slightly higher Sp was obtained (64.67%), the Se dropped by 49.57%. In all cases, a lower PPV (Positive Predictive Value) was recorded. The maximum values recorded in multiparous ewes by applying a threshold of 5 mS/cm, but with this threshold we only obtained Se = 18.96%. In contrast, at no time was the NPV (Negative Predictive Value) below 80%.

In experiment 2, we studied the effect of the milking fraction and health status of the mammary glands on milk EC, as well as the relation of EC with milk composition and the relationship between EC and SCC. Finally, as in experiment 1, we assessed the use of absolute EC thresholds as a detection method for mastitis in the different milking fractions. To do so, a single control was performed in which we analyse the EC, milk macro-composition and SCC of 178 glands of Manchega breed sheep in three milking fractions: the first 100 mL (F1); machine milk (F2); stripping milk (F3). For classification of the

glands according to their health status, three bacteriological controls were performed (one week beforehand, on sampling day and one week thereafter) in which samples were taken aseptically before the morning milking for subsequent bacteriological seeding and analysis.

Milking fraction, mammary gland health status and partum number of the ewes had a significant effect on EC and SCC. The interaction between health status and milked fraction only presented a significant effect on SCC.

The EC recorded in F1 was higher than that recorded in F2, which in turn was higher than that recorded for F3. When classifying the glands according to health status, although there was a decrease in EC as milking occurred, there were no significant differences between F2 and F3 in the mastitic glands.

The correlation between EC and SCC, although moderate, was significant in the three milk fractions. The changes in milk fat and lactose content explained to a great extent the variation in EC ($R^2_{\text{partial}} = 0.45$ and 0.30 respectively), with a negative relation observed between both variables and the EC of the milk.

For the same EC threshold, the Sp and Se varied slightly depending on the milking fraction. The cut-off point of both curves was given for a threshold of 4.2, 4.1 and 4.0 mS / cm in F1, F2 and F3 respectively, with Se and Sp values below 55% in all three fractions. The PPV remained around 20% for thresholds below 4.4 mS/cm. Increasing the threshold above 4.4 mS / cm improved the PPV of the method, but gave rise to a loss of Se. The NPV it remained above 80% for all proposed thresholds.

In assay 2, we carried out an experiment to study the effect of the onset of intramammary infection on the EC, SCC and production of the glands and its development in the post-infection period. We also evaluated the mastitis detection capacity of several algorithms based on daily measurement of the EC of glandular milk using a laboratory conductivity meter and a prototype designed for daily automatic reading of milk EC at mammary gland level during machine milking. To this end, we carried out a daily follow-up of the two milkings (morning and evening) to analyse the glandular EC and milk production of 26 sheep free of intramammary infection during 3.5 weeks. After this period, several unfavourable conditions for mammary gland health status which can occur in commercial farms were simulated, evaluating the health status of the glands during that period. The unfavourable conditions for mammary gland health status were prolonged until we had a sufficient number of infected glands, after which the experiment was extended for 3.5 weeks, during which daily monitoring of EC evolution and production was carried

out, bacteriological analyses were performed and the SCC was measured. Milk samples were taken on the first day of the SDS to determine its composition and thereafter at 4, 7, 11, 18, 21 and 28 days following onset of the infection. With the EC values registered (with the laboratory conductivity meter and with the prototype) at both milkings, we studied the behaviour of different calculation algorithms based on detecting deviations from the EC record at consecutive milkings.

The onset of intramammary infection caused an increase in SCC and a significant decrease in production, more pronounced in ewes infected bilaterally than unilaterally. The EC after on the onset of infection only rose significantly when the infection occurred bilaterally

With the daily EC measurements, we applied several algorithms based on the detection of anomalous variations in EC of the individual gland and on variations of the RELCE (EC relation between collateral glands), observing better results when using the latter.

The best results (Se = 91.7%; Sp = 90.9%; PPV = 91.7% and NPV = 90.9%) were obtained when applying a rule based on the detection of a deviation in RELCE three times the typical deviation compared to the average for RELCE from the records taken during the previous 10 days ($|\text{RELCE} - \text{RELCE}_{\text{med (10 days)}}| > 3 \sigma_{(10 \text{ days})}$), taking into account the whole of the 5 days after the onset of infection. With data recorded by the prototype, we also obtained high scores for Se and Sp, although the PPV and NPV were lower, which was attributed to the decalibration of the equipment observed throughout the experiment. We therefore recommend that automatic calibration methods be included when developing equipment for online measurement of EC.

In this experiment, the changes recorded in EC were explained to a great extent by the variation in lactose content ($R^2_{\text{partial}} = 0.43$). As for the correlation between EC and SCC, it was significant but moderate at both milkings, presenting a higher coefficient of correlation when $\text{SCC} > 400,000$ cells/mL and at the evening milking compared to the morning milking.

Based on the outcomes, we may conclude that the EC of milk in Manchego breed ewes is closely related with the milk composition, so it can be used as a method for detecting mastitis as long as the infection causes damage to the mammary gland able to alter the milk composition. There are also other non-infectious factors affecting milk EC: lactation stage, lactation number, milking session (morning or evening) or the milking

fraction. The use of absolute EC thresholds for mastitis detection is therefore not recommended. The use of calculation algorithms based on the comparison of the EC with previous daily EC measurements from the same gland that allow the detection of anomalous variations of the variable has obtained satisfactory results for mastitis detection. For proper “on-line” measurement of EC, further studies would be necessary, focusing on the design smaller-sized sensors that could be integrated into the short milk tube or milk cluster, fitted with an automatic calibration system, ensuring at all times that its manufacture is based on materials authorised for use in the food industry and which are not affected by the detergents used in the daily washing of milking machines.



ÍNDICE GENERAL.

	Página.
I. INTRODUCCIÓN.....	1
1. Importancia socioeconómica del ganado ovino.	1
2. La mastitis en el ganado ovino lechero.	2
2.1. Definición y tipos de mastitis.	2
2.2. Prevalencia de la infección intramamaria. Factores de variación	3
2.3. Etiología de la mastitis en ganado ovino.	4
2.4. Efectos de la mastitis en la calidad y la composición de la leche.....	8
2.4.1. Producción.	9
2.4.2. Composición.	10
3. Métodos de detección de mastitis.	23
3.1. Métodos directos.	24
3.2. Principales métodos indirectos de detección de mastitis.	24
3.2.1. California Mastitis Test (CMT)	25
3.2.2. Recuento de Células Somáticas (RCS)	25
3.2.3. Variaciones en la composición de la leche.	28
3.2.4. Variaciones en el pH de la leche.....	28
3.2.5. Proteínas de la Fase Aguda (PFA).	29
3.2.6. Determinación de la enzima N-acetyl-β-D-glucosaminidasa (NAGasa).	31
3.2.7. Medida de la Conductividad Eléctrica de la leche (CE).	32
4. La medida de la conductividad eléctrica como método de detección de mastitis.	
Factores de variación.	32
4.1. Factores intrínsecos al animal.	34
4.1.1. El propio animal.....	34
4.1.2. Raza.....	34
4.1.3. Estado de lactación.	35
4.1.4. Celo.	36
4.1.5. Número de lactación.	37
4.1.6. Composición de la leche.	37
4.2. Factores extrínsecos.	41
4.2.1. Alimentación.....	41
4.2.2. Intervalo entre ordeños.....	41
4.2.3. Fracción de leche ordeñada.....	42
4.2.4. Manejo de las muestras.	43
4.3. Modelos estadísticos o algoritmos de cálculo empleados para la formación del umbral de alarma para la detección de mastitis mediante el empleo de la medida de la CE.....	43
4.3.1. Umbrales absolutos de CE.	44
4.3.2. “Moving average” (media móvil).	45
4.3.3. “Tracking Signal Method” (Método de señal de búsqueda).	46
4.3.4. “Neural network” (Red neuronal).	47
4.3.5. “Bayesian network” (Red Bayesiana).	48
4.3.6. Otros métodos.	49
4.4. Dispositivos para la medida de la ce on-line.....	50
4.4.1. Conductímetros empleados en laboratorio.....	51
4.4.2. Conductímetros empleados en la industria.	53
4.4.3. Sensibilidad y especificidad de la CE en la detección de mastitis.....	58

II. OBJETIVOS.....	63
III. MATERIALES Y MÉTODOS GENERALES.....	65
1. Lugar de realización.....	65
2. Variables analizadas.....	67
2.1. Producción.....	67
2.2. Composición macroscópica y contenido mineral.....	68
2.3. Recuento de Células Somáticas (RCS).	69
2.4. Conductividad Eléctrica (CE) de la leche.	70
2.4.1. Medida de la CE “on-line”.....	70
2.5. Análisis bacteriológico.....	73
3. Definición del estado sanitario de las glándulas.	74
IV. FACTORES DE VARIACIÓN DE LA CONDUCTIVIDAD ELÉCTRICA EN LECHE DE OVEJAS MANCHEGAS.	77
IV. 1. EXPERIMENTO 1. RELACIÓN DEL ESTADO SANITARIO DE LA GLÁNDULA Y OTROS FACTORES NO INFECCIOSOS CON LA CE DE LA LECHE DE OVEJAS MANCHEGAS.	75
1. INTRODUCCION.....	77
2. MATERIALES Y MÉTODOS.....	79
2.1. Lugar de realización y animales utilizados.	79
2.2. Diseño experimental.....	80
2.3. Variables analizadas.....	80
2.4. Definición del estado sanitario de las glándulas.	81
2.5. Análisis estadístico.....	81
3. RESULTADOS.....	83
3.1. Incidencia y prevalencia de la infección.	83
3.2. Patógenos aislados durante el experimento.....	85
3.3. Factores asociados con la CE y el RCS en leche.	85
3.4. Correlación del RCS y la CE de la leche.....	91
3.5. Relación de la CE con la composición de la leche y el contenido mineral.	92
3.6. Detección de la infección intramamaria mediante umbrales absolutos de CE.....	93
4. DISCUSIÓN.....	96
IV. 2. EXPERIMENTO 2. EFECTO DE LA FRACCIÓN DE ORDEÑO EN LA CE DE LA LECHE DE OVEJAS MANCHEGAS.....	103
1. INTRODUCCIÓN.....	103
2. MATERIALES Y MÉTODOS.....	104
2.1. Lugar de realización y animales utilizados.	104
2.2. Diseño experimental y variables estudiadas.....	105
2.3. Variables analizadas.....	105
2.4. Definición del estado sanitario de las glándulas.	106
2.5. Análisis estadístico.....	106
3. RESULTADOS.....	108

3.1. Efecto de los factores considerados en la CE y el RCS en leche de ovejas de raza Manchega.	108
3.2. Relación de la CE con la composición de la leche y el contenido mineral.	110
3.3. Correlación del RCS y la CE de la leche.	112
3.4. Detección de mamitis mediante umbrales absolutos de CE y RCS.	112
4. DISCUSIÓN.....	115
IV. 3. CONCLUSIONES.	119
V. EFECTO DEL ESTABLECIMIENTO DE LA INFECCIÓN INTRAMAMARIA EN LA CONDUCTIVIDAD ELÉCTRICA DE LA LECHE DE OVEJA DE RAZA MANCHEGA Y ESTUDIO DE VARIOS ALGORITMOS PARA SU DETECCIÓN ON-LINE.....	121
1. INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS.....	121
2. MATERIALES Y MÉTODOS.....	124
2.1. Lugar de realización y animales utilizados.	124
2.2. Diseño experimental y variables estudiadas.....	124
2.3. Análisis estadístico.....	129
3. RESULTADOS.....	134
3.1. Incidencia y prevalencia de la infección.	134
3.2. Efecto de la instauración de la infección intramamaria en las variables estudiadas.	134
3.3. Relación de la CE con la composición de la leche y el contenido mineral.	142
3.4. Correlación del RCS y la CE de la leche.	142
3.5. Estudio del comportamiento del prototipo para la medida on-line de la CE de la leche.	143
3.5.1. Evolución de la lectura de CE realizada por el prototipo a lo largo del experimento.	144
3.6. Comportamiento de distintos algoritmos de cálculo para la detección de mamitis.	145
3.6.1. Capacidad de detección de mamitis de los algoritmos estudiados teniendo en cuenta los cinco días posteriores a la instauración de la infección por separado.....	145
3.6.2. Capacidad de detección de mamitis de los algoritmos estudiados teniendo en cuenta los cinco días posteriores a la instauración de la infección en conjunto	149
4. DISCUSIÓN.....	153
5. CONCLUSIONES.....	157
VI. CONCLUSIONES GENERALES.....	159
VII.REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	161

ÍNDICE DE TABLAS.

	Página.
I. INTRODUCCIÓN.....	1
Tabla I.1. Prevalencia de las infecciones intramamarias en ganado ovino según diversas fuentes.....	4
Tabla I.2. Frecuencia (%) de aislamiento de distintas especies de microorganismos causantes de mamitis en ganado ovino del total de especies identificadas.....	7
Tabla I.3. Variación de la concentración de materia grasa debido a la mamitis en elche de oveja según diversas fuentes.....	11
Tabla I.4. Variación del contenido en lactosa en leche de ganado ovino.....	15
Tabla I.5. Efecto de la mamitis en el contenido de Na ⁺ , K ⁺ y Cl ⁻ en leche de oveja.....	16
IV. FACTORES DE VARIACIÓN DE LA CONDUCTIVIDAD ELÉCTRICA EN LECHE DE OVEJAS MANCHEGAS.....	75
IV. 1. EXPERIMENTO 1. RELACIÓN DEL ESTADO SANITARIO DE LA GLÁNDULA Y OTROS FACTORES NO INFECCIOSOS CON LA CE DE LA LECHE DE OVEJAS MANCHEGAS.....	77
Tabla IV.1. Estado sanitario de las glándulas y ovejas al inicio y al final de la lactación.....	84
Tabla IV. 2. CE y RCS (Media ± σ) de la leche glandular en función del tipo de patógeno causante de la infección.....	85
Tabla IV.3. Resultado del análisis estadístico (valor F y nivel de significación) de las variables LCE y LRCS.....	86
Tabla IV.4. Resultado de la comparación de medias de LCE y LRCS según el ordeño.....	86
Tabla IV.5. LCE y LRCS según el número de parto y el estado sanitario de las glándulas.....	87
Tabla IV.6. Resultados del estudio de Correlación de la CE y el RCS.....	91
Tabla IV.7. Relación entre la composición físico-química y la CE de la leche.....	92
IV. 2. EXPERIMENTO 2. EFECTO DE LA FRACCIÓN DE ORDEÑO EN LA CE DE LA LECHE DE OVEJAS MANCHEGAS.....	103
Tabla IV.8. Resultado del análisis estadístico (valor F y nivel de significación) de las variables LCE y LRCS.....	108
Tabla IV.9. Resultado de la comparación de medias de LCE y LRCS según el estado infectivo de las glándulas.....	109
Tabla IV.10. Resultado de la comparación de medias de LCE y LRCS según la fracción de ordeño.....	109
Tabla IV.11. LCE según el estado infectivo de las glándulas y la fracción estudiada.....	110
Tabla IV.12. LRCS según el estado infectivo de las glándulas y la fracción estudiada.....	110
Tabla IV.13. Relación entre la CE y la macro-composición de la leche.....	111
Tabla IV.14. Resultados del estudio de Correlación de la CE y el RCS.....	112
V. EFECTO DEL ESTABLECIMIENTO DE LA INFECCIÓN INTRAMAMARIA EN LA CONDUCTIVIDAD ELÉCTRICA DE LA LECHE DE OVEJA DE RAZA MANCHEGA Y ESTUDIO DE VARIOS ALGORITMOS PARA SU DETECCIÓN ON-LINE.....	121
Tabla V.1. Estado sanitario de las glándulas antes y después de ser sometidas a Situaciones Desfavorables para la Salud de la glándula mamaria (SDS).....	134

Tabla V.2. CE de las glándulas infectadas en los 3 días previos y 3 días posteriores a la instauración de la infección en función del microorganismo aislado	135
Tabla V.3. Resultado del análisis estadístico (valor F y nivel de significación) de las variables CE, RCS y Producción de las glándulas.....	136
Tabla V.4. Evolución del LCE (media \pm error estándar, antilogaritmo de LCE (mS/cm)) del ordeño de la mañana según el estado sanitario de las glándulas y el periodo relativo a instauración de la infección.	137
Tabla V.5. Evolución del LCE (media \pm error estándar, antilogaritmo de LCE (mS/cm)) del ordeño de la tarde según el estado sanitario de las glándulas y el periodo relativo a instauración de la infección.	138
Tabla V.6. Evolución de la Producción (mL) (media \pm error estándar) del ordeño de la mañana según el estado sanitario de las glándulas y el periodo relativo a instauración de la infección.	139
Tabla V.7. Evolución de la Producción (mL) (media \pm error estándar) del ordeño de la tarde según el estado sanitario de las glándulas y el periodo relativo a instauración de la infección.....	139
Tabla V.8. Evolución del LRCS (media \pm error estándar, antilogaritmo de LRCS ($\times 10^3$ cel/mL)) del ordeño de la mañana según el estado sanitario de las glándulas y el periodo relativo a la instauración de la infección.....	141
Tabla V.9. Evolución del LRCS (media \pm error estándar, antilogaritmo de LRCS ($\times 10^3$ cel/mL)) del ordeño de la mañana según el estado sanitario de las glándulas y el periodo relativo a la instauración de la infección.....	141
Tabla V.10. Relación de la CE con la composición de la leche y su contenido mineral.	142
Tabla V.11. Correlación de la CE y el RCS.....	143
Tabla V.12. CE media medida con el conductímetro de referencia (CEref), con el prototipo (CEprot) y la diferencia entre ambas.	143
Tabla V.13. CE media medida con el conductímetro de referencia (CEref), con el prototipo (CEprot) y la diferencia entre ambas en el ordeño matutino.	144
Tabla V.14. CE media medida con el conductímetro de referencia (CEref), con el prototipo (CEprot) y la diferencia entre ambas en el ordeño de la tarde.	144
Tabla V.15. Test de efectos fijos, valor F y probabilidad en el análisis de Diferencia de CE de referencia y prototipo.	144
Tabla V.16. Media de la diferencia entre la medida del conductímetro de referencia y la del prototipo a lo largo del experimento.	145
Tabla V.17. Resultados de Se, Sp, VPP y VPN al aplicar los algoritmos* a las medidas de CE del conductímetro de referencia en el ordeño de la mañana, considerando los cinco días posteriores a la instauración de la infección por separado.....	146
Tabla V.18. Resultados de Se, Sp, VPP y VPN al aplicar los algoritmos* a las medidas de CE del conductímetro de referencia en el ordeño de la tarde, considerando los cinco días posteriores a la instauración de la infección por separado.....	147
Tabla V.19. Resultados de Se, Sp, VPP y VPN al aplicar los algoritmos* a las medidas de CE del prototipo en el ordeño de la mañana, considerando los cinco días posteriores a la instauración de la infección por separado.	148
Tabla V.20. Resultados de Se, Sp, VPP y VPN al aplicar los algoritmos* a las medidas de CE del prototipo en el ordeño de la tarde, considerando los cinco días posteriores a la instauración de la infección por separado.....	149

Tabla V.21. Resultados de Se, Sp, VPP y VPN al aplicar los algoritmos* a las medidas de CE del conductímetro de referencia en el ordeño de la mañana, considerando 5 días post-infección conjuntamente.	150
Tabla V.22. Resultados de Se, Sp, VPP y VPN al aplicar los algoritmos* a las medidas de CE del conductímetro de referencia en el ordeño de la tarde, considerando 5 días post-infección conjuntamente.	151
Tabla V.23. Resultados de Se, Sp, VPP y VPN al aplicar los algoritmos a las medidas de CE del prototipo en el ordeño de la mañana, considerando 5 días post-infección conjuntamente.	152
Tabla V.24. Resultados de Se, Sp, VPP y VPN al aplicar los algoritmos* a las medidas de CE del prototipo en el ordeño de la tarde, considerando 5 días post-infección conjuntamente.	152



ÍNDICE DE FIGURAS.

	Página.
I. INTRODUCCIÓN.....	1
Figura I.1. Sonda de conductividad y temperatura (Ferrero <i>et al.</i> , 2014).	53
Figura I.2. Equipos manuales para la detección de mamitis mediante CE en leche en granja.....	55
Figura I.3. Equipos utilizados para la lectura de CE “on-line” en la sala de ordeño. (Romero, 2009).	56
Figura I.4. Sistema Afimilk MPC. (www.afimilk.com).....	57
Figura I.5. Pezonera modificada utilizada para la medida de la CE on-line por cuarterón. (Zaninelli <i>et al.</i> , 2016).	57
III. MATERIALES Y MÉTODOS GENERALES.	67
Figura III.1. Panorámica de la sala de ordeño utilizada en los experimentos.	66
Figura III.2. Ovejas Manchegas con sus corderos antes del destete.	67
Figura III.3. A) Ordeño de las glándulas. B) Extracción de la leche del medidor.	68
Figura III.4. Milko Scan FT 120.	69
Figura III.5. Fossomatic 5000.	69
Figura III.6. Conductímetro de laboratorio GLP 32.....	70
Figura III.7. Esquema del habitáculo del prototipo.....	71
Figura III.8. A. Ordeño de las glándulas y medida de la CE con el prototipo de conductímetro para la medida on-line. B. Ordenador para la recogida de datos.	72
Figura III.9. Recogida de muestras para el análisis bacteriológico.....	73
IV. FACTORES DE VARIACIÓN DE LA CONDUCTIVIDAD ELÉCTRICA EN LECHE DE OVEJAS MANCHEGAS.....	79
IV. 1. EXPERIMENTO 1. RELACIÓN DEL ESTADO SANITARIO DE LA GLÁNDULA Y OTROS FACTORES NO INFECCIOSOS CON LA CE DE LA LECHE DE OVEJAS MANCHEGAS.....	79
Figura IV.1. Resultados de la comparación de medias del LCE a lo largo de la lactación en función del número de parto.	89
Figura IV.2. Resultados de la comparación de medias del RCS a lo largo de la lactación en función del número de parto.	89
Figura IV.3. Resultados de la comparación de medias del LCE a lo largo de la lactación en función del estado sanitario de las glándulas.	90
Figura IV.4. Resultados de la comparación de medias del LRCS a lo largo de la lactación en función del estado sanitario de las glándulas.	91
Figura IV.5. Sensibilidad y especificidad de la lectura de CE para la detección de mamitis (IV.5a), en función del ordeño (IV.5b) y del número de lactación (IV.5c).	94
Figura IV.6. VPP y VPN de la lectura de CE para la detección de mamitis (IV.6a), en función del ordeño (IV.6b) y del número de lactación (IV.6c).....	95

IV. 2. EXPERIMENTO 2. EFECTO DE LA FRACCIÓN DE ORDEÑO EN LA CE DE LA LECHE DE OVEJAS MANCHEGAS.	103
Figura IV.7. Sensibilidad y especificidad de la lectura de la CE para la detección de mamitis en función de la fracción de ordeño.	113
Figura IV.8. Valor Predictivo Positivo (VPP) y Valor Predictivo Negativo (VPN) de la lectura de la CE para la detección de mamitis en función de la fracción de ordeño.	113
Figura IV.9. Sensibilidad y especificidad del RCS para la detección de mamitis en función de la fracción de ordeño.	114
Figura IV.10. Valor Predictivo Positivo (VPP) y Valor Predictivo Negativo (VPN) del RCS para la detección de mamitis en función de la fracción de ordeño.	115



I. INTRODUCCIÓN.



I. INTRODUCCIÓN.

1. IMPORTANCIA SOCIOECONÓMICA DEL GANADO OVINO.

En la actualidad, el censo total de ovino en España se sitúa en 15.962.892 cabezas (MAPAMA, Noviembre 2016), ligeramente superior al del 2015. Del censo total, las ovejas destinadas a la producción de leche solo suponen un 15% (2.406.217 cabezas), estando agrupadas principalmente en dos comunidades autónomas; Castilla León y Castilla La Mancha, con el 47 y el 32% del censo de hembras en ordeño respectivamente y es en estas dos comunidades en las que se produce el 91% del total de leche de ovejas producida en el país.

La leche de oveja supone apenas el 6,89% del total de leche producida en España en el año 2015. Su principal destino (74% de la producción) fue la elaboración de queso puro de oveja.

En España, la principal raza lechera en número de cabezas es la Manchega, con un total de 185.982 animales inscritos en el Libro Genealógico, de los cuales 4.854 pertenecen a la variedad negra, catalogada como Raza Autóctona en Peligro de Extinción (ARCA, 2016). Según datos del Control Lechero Oficial, en 2016, la producción de leche por lactación y oveja fue de 203 L en primíparas y 230 L en multíparas por lactación natural. La producción por lactación normalizada a 120 días fue de 253 L/oveja. En cuanto a la variedad negra, la producción por lactación normalizada fue de 199 L, y de 153 y 172 L en ovejas primíparas y multíparas, respectivamente, por lactación natural de 154 días de duración.

La importancia de esta raza radica en que su leche es la materia prima para la elaboración de una de las figuras de calidad diferenciada más apreciadas del país: el Queso Manchego con Denominación de Origen Protegida (DOP). En la actualidad esta DOP tiene 525.829 ovejas inscritas en 785 ganaderías, con una producción de más de 65 millones de litros de leche. (Arias *et al.*, 2016). Debido a que objetivo final de la leche de ovino Manchego es la fabricación de quesos, su calidad debe ser considerada no solo por su composición, sino también por los parámetros tecnológicos para la elaboración del queso (Arias *et al.*, 2016), lo que justifica la investigación sobre todos aquellos aspectos que puedan afectar a dicha calidad, como puede ser la mamitis.

2. LA MAMITIS EN EL GANADO OVINO LECHERO.

2.1. DEFINICIÓN Y TIPOS DE MAMITIS.

La mamitis es la reacción inflamatoria de la glándula mamaria, como respuesta defensiva del animal frente a los elementos desencadenantes de la misma, que pueden ser de naturaleza infecciosa, traumática o tóxica (IDF, 1987), siendo el primero el más frecuente.

Su principal consecuencia es la pérdida de rentabilidad de las explotaciones por aspectos productivos (pérdida de producción por destrucción del tejido secretor, depreciación por pérdida de calidad higiénico-sanitaria de la leche, riesgo de sanciones por parte de las centrales lecheras, incremento de la reposición por cronificación...) o por aspectos sanitarios (muerte de animales afectados, cronificación, gastos de tratamiento y medicamentos, coste del veterinario). Además de las pérdidas directas ocasionadas por la mamitis, aparecen otras consecuencias que pueden derivar en perjuicios indirectos para todo el sector productor. Existe una relación negativa entre los altos Recuentos de Células Somáticas (RCS) en la leche y características tecnológicas para la producción de queso, como un aumento del tiempo de coagulación y de la velocidad de endurecimiento, además de una reducción de la dureza del coágulo (Gonzalo *et al.*, 1998 y Pirisi *et al.*, 2000). Romero *et al.* (2010) también observaron una relación entre la Conductividad Eléctrica (CE) de la leche de cabras Murciano-Granadinas y las características del queso fresco: Registraron un menor contenido proteico en el queso elaborado con leche con alta CE, equiparando sus resultados a los obtenidos por Pirisi *et al.* (2000) en los quesos elaborados con leche con altos RCS.

Las mamitis pueden clasificarse basándose en la intensidad de la respuesta inflamatoria, en la alteración de las características bioquímicas y macroscópicas de la leche, y en la manifestación de síntomas clínicos locales y/o generales (Contreras *et al.*, 1997). Mientras que las glándulas mamarias sanas no presentan síntomas de enfermedad y segregan leche exenta de microorganismos, las glándulas con mamitis subclínicas no presentan síntomas clínicos de la enfermedad pero la leche que producen se caracteriza por presentar un RCS más alto y una alteración de la composición bioquímica de la leche, aunque sin cambios macroscópicos con respecto a la leche procedente de glándulas sanas. Por el contrario, las mamitis clínicas presentan síntomas clínicos en la glándula mamaria, y

afectan al aspecto de la leche, la composición bioquímica, se incrementa el RCS así como la afección del estado general del animal. Las mamitis crónicas, caracterizadas por una continua inflamación de la glándula mamaria, se consideran incurables y pudiendo sufrir un proceso de agudización.

2.2. PREVALENCIA DE LA INFECCIÓN INTRAMAMARIA. FACTORES DE VARIACIÓN.

La prevalencia de infecciones intramamarias en ovino varía según la fuente consultada (Tabla I.1) entre el 4.6% (Mc Dougall *et al*, 2001) y el 39,9% (Leitner *et al*, 2001) a nivel de glándula y el 15% (Mc Dougall *et al*, 2002) y el 58% (Martins *et al*, 2013) a nivel de individuo. Estas diferencias observadas entre los distintos estudios pueden deberse a diversos factores, como son el estado de lactación de los animales, el número de lactación y las condiciones de manejo más o menos tecnificadas (Ziluaga *et al.*, 1998). En cuanto a las mamitis clínicas, su prevalencia suele ser menor del 5% (Bergonier *et al.*, 1997, Contreras *et al.*, 2007), siendo mucho menor que lo observado en ganado vacuno (25-50%, Seegers *et al.*, 1997).

Al-Majali y Jawabreh (2003) afirman que la incidencia de mamitis es mayor a partir de la tercera lactación, al igual que Leitner *et al.* (2003) quienes obtuvieron un 70,7 % de ubres sanas en animales que se encontraban en su primera lactación. Este porcentaje se redujo a medida que aumentaba el número de parto de la oveja, siendo 64,6% y 52,2% en animales de segundo y tercer parto respectivamente. Ergün *et al.* (2009), de acuerdo con los autores anteriores, también registraron una prevalencia menor en ovejas primíparas que en las múltiparas (4,1 y 7,4% respectivamente). Por el contrario, Mc Dougall *et al.* (2002) no encuentran relación entre la edad de la oveja y la incidencia de mamitis. Sevi *et al.* (2000), tampoco encontraron una relación entre el número de parto de las ovejas y la prevalencia de mamitis, pero sí vieron que en animales con pocas lactaciones, la infección aparecía de forma más temprana que en ovejas múltiparas, afirmando que eso puede ser debido al menor desarrollo del sistema inmunitario de las ovejas jóvenes, o una mayor susceptibilidad al estrés ambiental, de acuerdo con Bertoni (1996).

Tabla I.1. Prevalencia de las infecciones intramamarias en ganado ovino según diversas fuentes.

Referencia	Nº rebaños	Nº Ovejas	Nº muestras	% glándulas infectadas	% ovejas infectadas	Variación entre rebaños
Leitner <i>et al.</i> (2001)*	1	159	318	39,3		
Mc Dougall <i>et al.</i> (2001)	3	131	262	4,6		
Gonzalo <i>et al.</i> (2002)	7	1322	9592	24,6		
Mc Dougall <i>et al.</i> (2002)*	3	155		19	15	
Mc Dougall <i>et al.</i> (2002)**	3	153		9,1	9,1	
Albenzio <i>et al.</i> (2002)	5	380	1140		17,5	
Batavani <i>et al.</i> (2003)	12	178	209	39		
Al-Majali, y Jawabreh (2003)	12	318	1147	10,4	18,3	4,8-15,1***
Leitner <i>et al.</i> (2003)	20	815	1630		32	8,6-64,3
Winter <i>et al.</i> (2006)	7		5749		21,9	4,9-34,4
Martins <i>et al.</i> (2013)	1	37	444		58	
Addis <i>et al.</i> (2016)	3	705	705		20,6	
Caria <i>et al.</i> (2016)	12	300	540	23,85		-

*:Prevalencia al inicio de la lactación. **Prevalencia transcurridos 40 días del parto.

***Prevalencia de glándulas infectadas.

En cuanto a la influencia del estado de lactación y la prevalencia de mamitis subclínica, Leitner *et al.* (2001), en un trabajo realizado con 159 ovejas, observaron que el 90,6% de los casos no varió su estado infectivo a lo largo de la lactación, por lo que afirmaron que realizando un muestreo durante las dos primeras semanas se puede conocer el estado infectivo del rebaño a lo largo de la lactación. Por el contrario Mc Dougall *et al.* (2002), encontraron una prevalencia de mamitis subclínica en ovejas al inicio de lactación del 19%, que al cabo de 40 días disminuyó al 9,1% de forma que el 93,8% de las ovejas infectadas se curaron espontáneamente.

2.3. ETIOLOGÍA DE LA MAMITIS EN GANADO OVINO.

La mamitis puede ser ocasionada por numerosos agentes, que pueden ser de naturaleza infecciosa o no infecciosa, siendo las mamitis infecciosas las que se encuentran en la mayoría de los casos. Los agentes etiológicos de mamitis infecciosas más frecuentes son clasificados como patógenos mayores y menores en función del daño o lesión que

producen en la glándula mamaria. Tradicionalmente, los estafilococos coagulasa-positivos (ECP), principalmente *Staphylococcus aureus*, los estreptococos, las enterobacterias, *Pasteurella* spp., *Pseudomonas* spp., *Arcanobacterium pyogenes* y micoplasmas han sido considerados como patógenos mayores, mientras que los estafilococos coagulasa-negativos (ECN), los micrococcos, las corinebacterias y las levaduras, se han clasificado siempre como patógenos menores.

Algunos estafilococos coagulasa-negativos (ECN) pueden producir daños en las glándulas similares a los provocados patógenos mayores, presentando elevados RCS en leche (Ariznabarreta *et al.*, 2002; Gonzalo *et al.* 2002). Esto ha provocado la búsqueda de nuevos criterios de patogenicidad de los estafilococos. Ariznabarreta *et al.* (2002) y Gonzalo *et al.* (2002) proponen clasificarlos atendiendo a si presentan o no sensibilidad a la novobiocina en dos grupos: los que son sensibles al antibiótico y presentan un elevado RCS en la leche de la cual se han aislado (*S. aureus*, *S. hominis*, *S. epidermidis*, *S. caprae*, *S. haemolyticus*, *S. chromogenes*, *S. capitis*, *S. auricularis*, *S. hycus*) y los que son resistentes a la novobiocina y presentan un RCS más bajo, propio de patógenos menores (*S. xylosus* y *S. lentus*).

Otra clasificación empleada se basa en el hábitat principal del agente etiológico, obteniéndose la nomenclatura de contagiosos, ambientales y oportunistas. Así, el hábitat principal de los agentes infecciosos contagiosos es la glándula mamaria, de modo que el contagio se produce fundamentalmente durante el ordeño. Ejemplos de microorganismos pertenecientes a este grupo son *Streptococcus agalactiae* y *Mycoplasma* spp. Además se incluye en este grupo *Staphylococcus aureus*, aunque su hábitat principal no es el interior de la ubre. Los microorganismos ambientales infectan al animal mediante el contacto con materiales contaminados (suelos, camas, estiércol, agua, alimentos, etc.). A este grupo pertenecen los estreptococos no agalactiae y coliformes principalmente, aunque también se incluyen especies del género *Bacillus* y los Bacilos Gram negativos en general. De Garnica *et al.* (2013), aunque no realizaron un estudio a nivel de glándula o de individuo, sí encontraron diferencias en cuanto al porcentaje de muestras de tanque en las que obtuvieron aislamientos positivos de *E.coli* o de *S. aureus* en función del manejo llevado a cabo en la explotación o la época de recogida de muestras. El estudio lo llevaron a cabo a lo largo de un año en 172 rebaños de ovejas de raza Assaf y 33 de ovejas Churras, obteniendo mayor prevalencia d *S. aureus* en los meses de invierno y en los que no se realizaba ningún tipo de tratamiento frente a aquellos en los que sí se aplicaba un

tratamiento a las ovejas en el periodo de secado. En cuanto a la presencia de *E.coli*, ésta aumentó en otoño e invierno, afirmando los autores que podría ser debido a que en esta época se incrementa el confinamiento de las ovejas, disminuyendo el tiempo de pastoreo, con lo que aumenta el riesgo de contaminación fecal de la leche. También registraron una prevalencia mayor de ambas especies en las explotaciones en las que aún se realiza el ordeño de forma manual.

La mayoría de mamitis en ganado ovino son provocadas por estafilococos, pudiendo llegar a ser responsables del 100 % de las mamitis subclínicas (Mc Dougall *et al.*, 2002). La frecuencia de aislamiento de las diferentes especies es muy variable dependiendo de la fuente consultada (Tabla I.2), siendo los ECN los que mayores frecuencias de aislamiento presentan en la mayoría de los casos. Un ejemplo es el estudio realizado por Ergün *et al.* (2009) quienes obtuvieron que los ECN son los principales agentes causantes de mamitis, siendo aislados en los 16 rebaños de ovino lechero estudiados; de ellos, *S. epidermidis* representó el 35,7% de las especies aisladas, seguido por *S. saprophyticus* (10,2%), *S. xylosus* (10,2%), *S. warneri* (9,2%), y *S. intermedius* (7,1%). Los resultados de Gebrewahid *et al.* (2012) coinciden con lo anterior, encontrando que el 44,7% de los microorganismos causantes de mamitis en pequeños rumiantes fueron ECN. Aunque no es lo más común, en algunos estudios también se da el caso contrario; Al-Majali y Jawabreh (2003) y Mørk *et al.* (2007) solo aíslan ECN en un 17,9% y un 2,9% de los casos respectivamente, mientras que la frecuencia de aislamiento de ECP asciende al 39% y al 65% de los casos.

A pesar de que los ECN son los patógenos con mayor frecuencia de aislamiento, *S. aureus* ha sido aislado en la mayoría de los trabajos consultados, pero su frecuencia de aislamiento es muy variable, oscilando entre el 3,45% observado por Leitner *et al.* (2003) y el 65,3% de Mørk *et al.* (2007). La importancia de *S. aureus* no radica en su frecuencia de aislamiento, sino en que puede llegar a provocar síntomas clínicos severos (Contreras *et al.*, 2007), pudiendo ocasionar la pérdida de la glándula mamaria e incluso la muerte de la oveja.

Tabla I.2. Frecuencia (%) de aislamiento de distintas especies de microorganismos causantes de mamitis en ganado ovino del total de especies identificadas.

Microorganismos	Leitner <i>et al.</i> (2001)	Albenzio <i>et al.</i> (2002)	Gonzalo <i>et al.</i> (2002)	Mc Dougall <i>et al.</i> (2002)	Leitner <i>et al.</i> (2003)	Batavani <i>et al.</i> (2003)	Al-Majali y Jawabreh (2003)	Mørk <i>et al.</i> (2007)	Ergun <i>et al.</i> (2009)	Gebrewahid <i>et al.</i> (2012)	Addis <i>et al.</i> (2016)
<i>Staphylococcus</i>	86,4	43,7	69,54	100	65,7	63	56,9	68,2	-	-	-
EC positivos	12	13,3	4,32	33,3	3,45	22	39	65,3	-	-	-
<i>S. aureus</i>	-	13,3	4,32	33,3	3,45	22	39	65,3	-	-	-
<i>S. intermedius</i>	10,4	-	-	-	-	-	-	-	7,1	-	-
<i>S. hycus</i>	1,6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
EC negativos.	60	21,3	-	66,7	42,1	41	17,9	2,9	67,1	44,7	74,5
<i>S. epidermidis</i>	6,4	-	-	-	16,7	-	-	-	37,5	-	44,1
<i>S. simulans</i>	2,4	-	-	-	1,2	-	-	-	-	-	-
<i>S. chromogenes</i>	13,6	8,4	-	-	22,1	-	-	-	-	-	-
<i>S. haemolyticus</i>	21,6	-	-	-	2,1	-	-	-	-	-	-
<i>S. lugdunensis</i>	4,8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>S. xylosus</i>	3,2	12,9	-	-	-	-	-	-	10,2	-	-
ECNSN	-	-	51,6	-	-	-	-	-	-	-	-
ECNRN	-	-	10,6	-	-	-	-	-	-	-	-
No identificados	22,4	9,1	3	-	23,6	-	-	-	-	-	-
<i>Bacillus cereus</i>	-	-	-	-	-	33	-	-	-	-	-
<i>Micrococcus</i>	2,4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Streptococcus</i>	11,2	-	2,2	-	4,2	4	25	4,6	-	-	-
<i>Strep. agalactie</i>	-	2,1	1,65	-	-	-	-	1,65	-	-	-
<i>Strep. bovis</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Corinobacterium</i>	-	2,8	13,84	-	11,5	-	-	-	-	-	-
<i>A. pyogenes</i>	-	-	0,72	-	-	-	-	-	-	-	-
Enterobacterias	-	-	2,07	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>E. coli</i>	-	41,9	-	-	-	-	19	7,3	-	-	-
<i>Klebsiella</i>	-	-	-	-	-	-	-	0,4	-	-	-
<i>pneumoniae</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Pasteurella</i>	0,8	-	0,38	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Ps. Aeruginosa</i>	-	10,5	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Pseudomonas spp.</i>	-	-	-	-	2,7	-	-	-	-	-	-
Cultivos mixtos	-	-	7,95	-	-	-	-	-	-	-	-
Otros	-	-	-	-	14,8	-	-	19,5	-	-	12,3

EC: Estafilococos coagulasa. ECNSN: EC negativos sensibles a la novobiocina; ECNRN: EC negativos resistentes a la novobiocina.

En los trabajos consultados los estreptococos son aislados en porcentajes muy bajos, desde el 2,2% (Gonzalo *et al.*, 2002) hasta el 11,2% (Leitner *et al.*, 2001) por lo que su importancia cuantitativa es escasa. Los bacilos Gram negativos son aislados con escasa frecuencia e incluso no se detectan. Sin embargo dan lugar a elevaciones importantes del RCS. Las más frecuentes son *E. coli* (Albenzio *et al.*, 2002; Al-Majali y Jawabreh, 2003 y Mørk *et al.*, 2007), que puede ser un indicativo de pobres condiciones higiénicas. La mayoría de mamitis clínicas y subclínicas son causadas por un único agente patógeno, aunque también hay casos de cultivos mixtos, con una frecuencia de aislamiento muy baja.

2.4. EFECTOS DE LA MAMITIS EN LA CALIDAD Y LA COMPOSICIÓN DE LA LECHE.

La mamitis infecciosa es producida por la penetración del agente etiológico en la glándula mamaria. La principal vía de penetración hacia la glándula es el canal del pezón, teniendo menor importancia la traumática (heridas). Una vez que el patógeno ha conseguido salvar las barreras físicas del pezón debe superar las defensas del animal para lograr la colonización de la glándula. Los mecanismos defensivos del animal son los factores bactericidas presentes en la leche (ej.: lisozima) o el sistema inmunitario (factor humoral y celular), desarrollándose durante el proceso una inflamación en la ubre por el aumento de flujo sanguíneo hacia la mama y la afluencia de leucocitos (Polimorfos nucleares neutrófilos principalmente, que incrementa el RCS de la leche) y determinadas proteínas séricas y enzimas (fase aguda de la mamitis). Si, a pesar del mecanismo del sistema inmunitario, el patógeno logra colonizar el tejido mamario, su mecanismo de acción (liberación de toxinas y exopolisacáridos y adherencia al tejido glandular) causará daños en el tejido glandular que provocará una reducción de las funciones de síntesis del mismo y un aumento de las de filtración, a causa del aumento de la permeabilidad de los lactocitos frente al fluido vascular (Kitchen, 1981), lo que se traducirá en una menor eficiencia de síntesis de leche y en variaciones de la composición, con respecto a la glándula sana.

El incremento de RCS que se produce, se relaciona con cambios en la composición de la leche y sus características de coagulación. La leche de oveja para quesería con RCS elevados ($RCS > 10^6$ cel/mL) puede tardar el doble de tiempo en coagular en comparación a muestras de leche por debajo de 500×10^3 cel/mL (Pirisi *et al.*, 1994). Martí de Olives *et*

al. (2015), en ovejas Manchegas, concluyeron que el tiempo de coagulación de la leche empieza a aumentar significativamente cuando el RCS en tanque supera las 1.000×10^3 cel/mL y observaron un incremento de la proteólisis en leche a partir de un umbral de 500×10^3 cel/mL. Además, la migración de los PMN desde el parénquima glandular hacia el lumen alveolar también provoca daños en el tejido que serán más graves cuanto más prolongada sea la respuesta inmunitaria, lo que conlleva una reducción de la producción. Estos efectos sobre la cantidad y la calidad de la leche producida tienen gran importancia en la economía de las explotaciones ganaderas, por lo que son objeto de revisión a lo largo del presente capítulo.

2.4.1. Producción.

La mamitis causa pérdidas en la producción y modificaciones en el porcentaje de los componentes principales de la leche como resultado de los daños en los tejidos secretores de la glándula mamaria (Burriel, 1997; Burriel y Wagstaff, 1998), con la consiguiente reducción en la función de síntesis y secreción de la misma.

En ganado vacuno, la disminución en la producción de leche puede observarse al menos una semana antes del diagnóstico de la mamitis clínica (Lucey *et al.*, 1986; Ostergaard y Grohn, 1999; Rajala-Schultz *et al.*, 1999; Bareille *et al.*, 2003; Grohn *et al.*, 2004; Wilson *et al.*, 2004 y Hagnestam *et al.*, 2007) debido a que la enfermedad está presente en su forma subclínica antes de la aparición de los primeros síntomas clínicos (Hagnestam *et al.*, 2007). Santos *et al.* (2004) afirmaron que el efecto de la mamitis sobre la producción, en ganado vacuno, es más grave cuando ésta se instaura al inicio de la lactación. Martí De Olives *et al.* (2013), observaron el mismo efecto en ovejas Manchegas. Registraron una diferencia de producción entre ovejas que se infectaron en el periodo postparto y ovejas sanas superior a la registrada entre ovejas que se infectaron en una fase más avanzada de la lactación y ovejas sanas. La disminución de la producción en las glándulas infectadas se produjo en la misma semana en la que se diagnosticó la infección, observando también un efecto compensatorio de la producción en la glándula colateral sana, en las que registraron un incremento de la producción. Gonzalo *et al.* (2002) observaron una disminución de la producción en las ovejas con mamitis subclínica respecto a las sanas (880 mL/día), aunque no fue significativa en ovejas infectadas por patógenos menores (857 mL/día) o las que presentaron infección bilateral causada por

ECN sensibles a la novobiocina (848 mL/día). En el caso de ovejas que presentaron una infección unilateral causada por ECN sensibles a la novobiocina o por patógenos mayores (835 y 803 mL/día, respectivamente) esta disminución sí fue significativa, pero la mayor reducción de la producción (10,1%) fue en las ovejas infectadas bilateralmente por patógenos mayores, en las que solo se registró una media de 791 mL/día. Leitner *et al.* (2004) también observaron este efecto de la mamitis en la producción lechera de ganado ovino, registrando una disminución significativa en glándulas infectadas (0,36 kg/ordeño) con respecto a la de las glándulas no infectadas (0,76 kg/ordeño). Los mismos autores, en estudios posteriores afirman que en un rebaño con un 75% de glándulas infectadas, la disminución de la producción puede llegar a ser del 12,2% en ganado ovino, mientras que en ganado caprino, con el mismo porcentaje de glándulas infectadas, las pérdidas son sólo del 2,3% (Leitner *et al.*, 2008) y que la alteración de la composición de la leche y su consecuente disminución del rendimiento quesero, es más acusado en esta especie que en ganado vacuno o caprino (Leitner *et al.*, 2011). Díaz *et al.* (2011), realizaron un experimento en el que midieron diariamente la producción por glándula de 18 cabras murciano-granadinas a lo largo de 32 días consecutivos (16 antes y 16 después del establecimiento de una infección intramamaria) y en el que clasificaron las glándulas en cuatro niveles según su estado sanitario (sanas de cabras que permanecieron sanas todo el experimento, sanas o infectadas de cabras que se infectaron de forma unilateral a lo largo del experimento e infectadas de cabras que se infectaron de forma bilateral durante el experimento). Los autores, observaron un efecto significativo del estado sanitario de la glándula mamaria y del periodo de tiempo transcurrido respecto al establecimiento de la infección en la producción, pero no de la interacción entre ambos, por lo que afirmaron que la producción de las glándulas se vio afectada del mismo modo por la instauración de la infección, independientemente del estado sanitario de éstas.

2.4.2. Composición.

- **Materia grasa:**

El efecto que la mamitis provoca sobre la producción de materia grasa es variable e incluso contradictorio según la fuente consultada (Tabla I.3). Algunos autores encontraron que el contenido de materia grasa de leche procedente de glándulas infectadas era menor

que el de la leche de glándulas sanas (Albenzio *et al.*, 2002; Leitner *et al.*, 2004c; Bianchi *et al.*, 2004). Esta disminución puede llegar a ser del 35 % en glándulas infectadas con *Staphylococcus aureus* respecto a las glándulas control (Fragkou *et al.*, 2008). Santos *et al.* (2007), en un estudio en ganado ovino en el que se inoculó *S. aureus* encontraron que la infección dio lugar a una significativa reducción de grasa inicialmente y, después, a una disminución global de la secreción de los componentes de la leche.

Tabla I.3: Variación de la concentración de materia grasa debido a la mamitis en elche de oveja según diversas fuentes.

Referencias	Contenido graso (%)		% Variación	Origen de la infección
	Sanas	Infectadas		
Albenzio <i>et al.</i> , 2002	-	-	- 7	Natural
Leitner <i>et al.</i> , 2003	4,68	5,29	+ 0,61	Natural
Leitner <i>et al.</i> , 2004 ¹	64,90	61,7	-3,2	Natural
Bianchi <i>et al.</i> , 2004	7,06	6,16	-0,9	Natural
Santos <i>et al.</i> , 2007	-	-	-35	Inducida con <i>S. aureus</i>
Fragkou <i>et al.</i> , 2008	7,00	4,50	-2,5	Inducida con <i>Mannheimia haemolytica</i>
Leitner <i>et al.</i> , 2011 ^{1,4}	72,7	68,7	-5,5	Inducida; <i>S. epidermidis</i> o <i>S. chromogenes</i> .
Martins <i>et al.</i> , 2013	5,68	6,17 ²	+8,6	Natural
Martins <i>et al.</i> , 2013	5,68	7,12 ³	+25,4	Natural

¹ Contenido graso expresado en g/L; ² Mamitis subclínica. ³ Mamitis clínica. ⁴ No observaron diferencias significativas.

Por otro lado, Leitner *et al.* (2003) obtuvieron un incremento del porcentaje de materia grasa en glándulas infectadas (5,29%) en comparación con glándulas sanas (4,68%), aunque en este caso no fue significativo. De acuerdo con lo anterior, Burriel (1997) observó un aumento en el porcentaje de grasa y proteína a causa de la infección por ECN, afirmando que esto se debe a que además de una reducción de la síntesis de los componentes de la leche, la mamitis provoca una disminución del volumen de leche producida, lo que conlleva un incremento del porcentaje de diversos componentes (Leitner *et al.*, 2003; Burriel, 1997; Schultz, 1977). Martins *et al.* (2013) también observaron este incremento, registrando valores de 5,68, 6,17, y 7,12% de materia grasa en glándulas sanas, con mamitis subclínica o con mamitis clínica respectivamente.

También se encuentran estudios en los que no se ha observado ningún efecto del estado infectivo en el porcentaje graso de la leche (Torres-Hernández y Hohenboken, 1979; y Díaz *et al.*, 1996). En ovejas de la raza Manchega, Martí de Olives *et al.* (2013) no encontraron variación en el porcentaje de grasa a causa de la instauración de la infección intramamaria, afirmando que la grasa y la caseína se modifican de un modo u otro dependiendo de la magnitud de la reducción de la producción. Así, estos autores destacan que la reducción en el volumen de leche producida como resultado de la infección intramamaria es frecuentemente mayor que la disminución en la síntesis de grasa y caseína, lo que da lugar a que la concentración de estos componentes en la leche se mantenga estable. En un estudio posterior, realizado en muestras de tanque de explotaciones de ovejas Manchegas, Martí de Olives *et al.* (2015) tampoco obtuvieron diferencias significativas entre el contenido graso de muestras de tanque con altos RCS y con bajos RCS, a pesar de que observaron que el porcentaje de grasa de la leche tendía a aumentar a medida que aumentaba el RCS.

- **Proteínas:**

Al igual que ocurre con la materia grasa, el efecto que provoca la infección intramamaria en el contenido en proteínas de la leche de ganado ovino varía en función de la fuente consultada, de forma que puede no ser significativa (Díaz *et al.*, 1996; Martí de Olives, 2005), producir un ligero aumento (Bianchi *et al.*, 2004; Leitner *et al.*, 2004) o descender (Albenzio *et al.*, 2002; Fragkou, 2008).

Globalmente, existe un incremento en los niveles de proteínas totales y compuestos proteínicos ligados a la inflamación y a la respuesta inmune; y un descenso en las proteínas endógenas de la leche tales como la caseína. Los componentes que llegan de la sangre, como las proteínas séricas, normalmente aumentan debido a la mayor permeabilidad de la barrera sangre-leche durante la infección. Leitner *et al.* (2003) encontraron que la leche de glándulas con mamitis subclínicas tenía un 7,2% más de proteínas que la leche de glándulas sanas, valor similar al observado por Bianchi *et al.* (2004). Díaz *et al.* (1996), en un trabajo realizado con ovejas de raza Manchega observaron un aumento de la proteína bruta en las glándulas mamíticas, afirmando que esto se debía principalmente al aumento de las proteínas del suero, ya que el porcentaje de caseínas no se vio afectado significativamente por la infección. Arias *et al.* (2016) en una revisión realizada sobre la

calidad y la composición de la leche en ovino Manchego, observaron que el contenido en proteína en esta raza varió entre el 5,96% registrado en ganaderías perteneciente al Consejo de la Denominación de Origen Protegida (DOP) y el 5,80% que obtuvieron en las ganaderías incluidas dentro del programa de mejora de la raza llevado a cabo por la Asociación Nacional de Ganado Ovino Selecto de raza Manchega (AGRAMA). Martí de Olives *et al.* (2013), en ovejas Manchegas obtuvieron un porcentaje de proteína ligeramente inferior a las medias obtenidas por Arias *et al.* (2016), siendo en glándulas infectadas, del 5,63% y 5,81% en el periodo posparto o en el transcurso de la lactación y menor en sus colaterales sanas (5,38 y 5,50%). Estos autores, al mismo tiempo, registraron un descenso del ratio caseína:proteína y un incremento significativo de las proteínas del suero, atribuyéndolo a un aumento de la permeabilidad de la barrera sangre-leche durante la infección. Los resultados en cuanto al ratio caseína:proteína obtenidos por Martí de Olives *et al.* (2015) son similares a los obtenidos en estudios previos por los mismos autores, y también en ovejas Manchegas, registrando un descenso del ratio caseínas:proteína en muestras de tanque con altos RCS en comparación con las muestras con bajo RCS. Estos resultados están de acuerdo con Leitner *et al.* (2011), quienes, a pesar de no observar una variación en el contenido proteico total de la leche procedente de glándulas infectadas respecto a la procedente de glándulas sanas en ovejas Assaf, si registraron un descenso en el porcentaje de caseínas en las glándulas infectadas. Merin *et al.* (2004) concluyeron que la producción de cuajada a partir de leche de ovino y caprino procedente de glándulas infectadas por ECN era menor que cuando procedía de glándulas no infectadas, debido a que las concentraciones de caseínas era menor en las glándulas infectadas.

En cuanto a la relación del RCS con las proteínas de la leche, en varios trabajos se ha puesto de manifiesto la existencia de una correlación positiva cuyo coeficiente varía entre 0,09 y 0,35 según la fuente consultada (Bedö *et al.*, 1995; Fuertes *et al.*, 1998; El Saied *et al.*, 1998; Wójtowski *et al.*, 1998).

- **Lactosa:**

En ganado ovino, se ha observado que el contenido de lactosa en la leche, disminuye con la infección (Díaz *et al.*, 1996; Burriel, 1997; Bianchi *et al.*, 2004), principalmente a causa de la reducción de la capacidad de síntesis de los tejidos dañados (Burriel, 1997)

pero también a una menor disponibilidad de su precursor, la glucosa, debido a la competencia por la energía entre las células secretoras y las que tienen funciones fagocitarias (Rulquin, 1997). Otro posible motivo de este descenso es su paso hacia el fluido extracelular y la sangre como consecuencia de la destrucción de las membranas celulares. Por lo tanto, las bajas concentraciones de lactosa dependerán de la gravedad del daño producido en las uniones entre células (Stelwagen *et al.*, 1999) y en su estructura celular. Además, la lactosa está directamente implicada en la disminución de la producción de leche por su función como regulador osmótico de la secreción láctea a nivel celular. Peaker (1977) demostró que el contenido en lactosa está relacionado con la concentración iónica de la leche, ya que pequeñas variaciones en la concentración de lactosa se veían acompañadas de cambios de orden inverso en la concentración de iones sodio y cloro. Así, una disminución del contenido en lactosa de la leche implica una reducción del volumen de ésta, tanto en ganado vacuno (Munro *et al.*, 1984) como en ovino (Burriel, 1997).

Como se observa en la Tabla I.4, Leitner *et al.* (2003) encontraron un porcentaje de lactosa del 5,30% en glándulas sanas con una producción de 2,77 kg/día y una disminución de este porcentaje al 4,72% y de la producción a 2,55 kg/día, en ovejas con mamitis. Bianchi *et al.* (2004), en ovejas Sargas, registraron un porcentaje significativamente inferior de lactosa en glándulas mamíticas (4,45%) con respecto a las glándulas sanas (4,90%), pero no registraron diferencias en cuanto a la producción. Martins *et al.* (2013) también encontraron niveles inferiores de lactosa en leche de ovejas con mamitis clínica, apoyando la teoría de que el daño en el tejido secretor conlleva una disminución en la biosíntesis de lactosa. Burriel *et al.* (1997) observaron una reducción del 9,7% al inducir la infección con ECN, en cambio, no encontraron diferencias en el contenido en lactosa en muestras de leche con alto RCS y bacteriología negativa. En ganado ovino Manchego, Martí de Olives *et al.* (2015) observaron un descenso del contenido en lactosa de la leche a medida que aumentaba el RCS en tanque, siendo significativamente superior el valor que registraron cuando el $RCS < 500 \times 10^3$ cel/mL (5,61%) que cuando el RCS superaba ese umbral. En este sentido, Antonič *et al.* (2013) también observaron un descenso de la lactosa al incrementarse el RCS en leche, obteniendo un coeficiente de correlación negativo entre ambas variables ($r = -0,467$).

Tabla I.4. Variación del contenido en lactosa en leche de ganado ovino.

Referencias	% lactosa		% Variación	Origen de la infección
	Glándula sana	Glándula infectada		
Díaz <i>et al.</i> (1996)	4,99	4,76	-4,6	Natural ⁽¹⁾ (ECN, Str. Uberis)
Burriel (1997)	5,1	4,58	-9,7	Inducida (ECN)
Burriel (1997)	5,1	5,07	0	Inducida (Bacteriología negativa)
Leitner <i>et al.</i> (2003)	5,30	4,72	-10,9	Natural (ECN)
Leitner <i>et al.</i> (2004)	44,7 ⁽²⁾	33,5 ⁽²⁾	-25	Natural (ECN)
Bianchi <i>et al.</i> (2004)	4,65	4,51	-3	Natural
Fragkou (2008)	4,55	3,55	-21	Inducida (<i>Mannhemia haemolytica</i>)

1. Mamitis clínicas y subclínicas. 2. Cantidad de lactosa expresada en g/l.

- **Contenido mineral:**

El tejido secretor de la glándula mamaria, está dotado de diversos sistemas que ayudan a mantener la diferencia de concentración de iones (principalmente Na⁺, Cl⁻ y K⁺) que existe entre la sangre y la leche (Hamann y Zeconni, 1998). De este modo, en condiciones normales, existen dos “barreras impermeables” que regulan el transporte de iones: la barrera sangre–intersticio y la barrera intersticio–leche, debiendo los iones seguir un camino transcelular para llegar desde la sangre hasta la leche. Durante este camino, deberán pasar a través de los sistemas de transporte activo presentes en las membranas basolaterales de las células epiteliales, mediante los cuales los iones sodio son enviados hacia el intersticio celular y los iones potasio al interior celular. Con este sistema se consigue que en el fluido intersticial y en la sangre el ratio Na:K sea de 30:1, mientras que en el fluido intracelular y en la leche es de 1:3. El paso de estos iones del interior celular al lumen alveolar, y su incorporación a la leche, se realiza mediante difusión pasiva.

Los trabajos disponibles en ganado vacuno indican que la mamitis, además de provocar una modificación de los componentes mayoritarios de la leche, también ocasiona, por una parte, una disminución del calcio, fósforo y potasio y, por otra, un aumento de cloruros y sodio (Hamann y Zeconni, 1998). Siendo escasos los trabajos publicados acerca del efecto de la mamitis en el contenido de sodio, fósforo y potasio en ganado ovino.

Sodio, Potasio y Cloruros.

Hamed *et al.* (1993) encontraron un incremento del 17% del contenido en cloruro en glándulas infectadas respecto a glándulas sanas (1300 y 1520 mg/kg en glándulas sanas y glándulas infectadas, respectivamente). Bianchi *et al.* (2004) también observaron un ligero aumento de los cloruros en leche de glándulas infectadas, aunque las diferencias no fueron significativas (1870 mg/kg en glándulas sanas y 1970 mg/kg en glándulas infectadas). Santos *et al.* (2007) registraron valores de 136,7 mEq/L en glándulas infectadas (a las 24h de inducir la infección con *S. aureus*) mientras que en glándulas sanas la concentración de cloruros fue de 103,45 mEq/L (Tabla.I.5). Caria *et al.* (2016), registraron una media contenido en cloruros de 143,9 mg/L en leche de oveja Sarda, y obtuvieron un coeficiente de correlación significativo y positivo, aunque moderado ($r = 0,407$), entre el contenido en cloruros y el RCS en leche. Burriel (1997) observó que al inducir la infección con ECN, el contenido en sodio aumentó un 83% (14,7 mmol/L en glándulas sanas frente 26,9 mmol/L en glándulas infectadas), obteniendo una correlación con el RCS de 0,59. En este mismo trabajo también estudiaron el efecto de la mamitis sobre la concentración de potasio, obteniendo un descenso del 3,8% (con una concentración de 36,3 mmol/L en glándulas sanas y 34,9 mmol/L en glándulas infectadas). Debido a estos cambios en la concentración de ambos iones, la relación Na^+/K^+ pasó de 1:2,5 a 1:1,3, lo que refuerza la idea del desequilibrio osmótico que provoca la infección.

Tabla I.5. Efecto de la mamitis en el contenido de Na^+ , K^+ y Cl^- en leche de oveja.

Mineral	Referencia	Glándulas sanas	Glándulas infectadas	% Variación	Origen de la infección.
Cl^-	Hamed <i>et al.</i> , (1993)	0,13%	0,152%	17%	Natural
	Bianchi <i>et al.</i> , (2004)	0,187%	0,197%	NS	Natural
	Santos <i>et al.</i> , (2007)	103,45mEq/L	136,7mEq/L	32%	Inducida (<i>S. aureus</i>)
Na^+	Burriel y Wagstaff (1998)	14,7mmol/L	26,9mmol/L	83%	Inducida (ECN)
K^+	Burriel y Wagstaff (1998)	36,3mmol/L	34,9mmol/L	-3,8%	Inducida (ECN)
Na^+/K^+	Burriel y Wagstaff (1998)	1/2,5	1/1,3		Inducida (ECN)

En ganado caprino, Ying *et al.* (2004) observaron en la raza Saanen un aumento del contenido en sodio debido a la mastitis (506 ppm en las ubres infectadas vs 322 ppm en las sanas). En el mismo trabajo, en la raza Alpina, los resultados fueron similares, aunque el incremento observado fue menor (428 vs 393 ppm). Díaz *et al.* (2012), en cabras Murciano-Granadinas, registraron un incremento de la relación Na^+/K^+ cuando la infección se estableció de forma bilateral (de 0,3201 pasó a 0,4039 tras el establecimiento de la infección), pero no registraron cambios significativos en la leche de glándulas infectadas pertenecientes a animales en los que la infección se estableció de forma unilateral. Con respecto al ión cloruro, Barros y Leitao (1992) encontraron que la mastitis inducida con *S. aureus* provocaba un incremento en los cloruros de 1800-1500 mg/kg (3900-3400 mg/kg en las ubres infectadas y 2100-1900 mg/kg en las sanas) en ganado caprino. De acuerdo con estos autores, Díaz *et al.* (2012) registraron un incremento significativo en el contenido en cloruros en la leche de glándulas infectadas de cabras Murciano-Grandinas. En las glándulas de cabras que se infectaron de forma unilateral, el contenido en cloruros se incrementó de 1.891 mg/L a 2.018 mg/L tras el establecimiento de la infección; y en la leche de las glándulas de las cabras que se infectaron de forma bilateral, registraron una concentración de 2.082 mg/L antes de la infección, que se incrementó hasta los 2.213 mg/L tras el establecimiento de la infección. Por el contrario, Ying *et al.* (2004) observaron que la infección intramamaria provocaba un descenso, tanto en la raza Saanen (2264 ppm en las infectadas vs 2463 ppm en las ubres sanas) como en la Alpina (2117 contra 2447 ppm en las ubres infectadas y sanas, respectivamente). Gadjusek *et al.* (1996) encontraron una correlación negativa y significativa del RCS con el calcio, fósforo y potasio, mientras que no fue significativa con el sodio y los cloruros.

En cuanto al efecto de la mastitis sobre la concentración de estos minerales en la leche de ganado vacuno, Fernando *et al.* (1985) encontraron un aumento paulatino del contenido en cloruros en las diferentes fracciones de leche analizadas en función de si se trataba de cuarterones sanos, infectados con patógenos menores o con patógenos mayores respectivamente, aunque la correlación con el RCS fue muy baja ($r = 0,22$). Holdaway *et al.* (1996) encontraron que la infección intramamaria provocaba una reducción de la concentración en lactosa en las tres fracciones estudiadas (primeros chorros, leche máquina y apurado), mientras que la concentración de sodio aumentaba y la de potasio no se veía afectada. Bruckmaier *et al.* (2004a) observaron un incremento de las concentraciones de sodio (30 vs 22 mmol/mL) y cloruro (38 vs 31 mmol/mL) en las glándulas con $\log\text{RCS} > 6$

con respecto a sus colaterales sanas ($\log\text{RCS}<6$) mientras que el ión potasio no se vio afectado (39 vs 42 mmol/L). El Zubeir *et al.* (2005) encontraron que la mamitis clínica provocaba un aumento significativo del sodio y un descenso del potasio, pero en el caso de mamitis subclínica, solo encontraron un aumento del sodio mientras que no hubo diferencias significativas en el caso del potasio. Yildiz *et al.* (2006) obtuvieron que la mamitis subclínica produjo un aumento en el contenido en sodio y un descenso en los niveles de potasio en la leche, pasando de 56,16 y 170,57 mg/dL, respectivamente, en glándulas sanas a 68,90 y 113,92 mg/dL en glándulas infectadas, si el RCS medio era de 709.677 cel/mL (Test de California +1) y a 76,46 y 82,52 mg/dL con RCS medio de 1.312.640 cel/ml (Test de California +2). Bruckmaier *et al.* (2004b) observaron que tras la inoculación de la toxina de *E.Coli* se producía un aumento de las concentraciones de sodio y cloruro, con el pico máximo a las 12 h, para descender hasta los niveles previos a la inoculación tras 38 h. En un experimento similar, Werner-Misof *et al.* (2007) observaron que la inoculación no provocaba diferencias significativas en los niveles de sodio, pero sí aumentaba significativamente el cloruro.

- **Enzimas:**



En la leche pueden encontrarse una gran variedad de enzimas, algunas de las cuales pueden aumentar su concentración en la leche con la mamitis. Además, las células somáticas, que también aumentan en el caso de mamitis, pueden liberar algunas enzimas que pueden sumarse a la mencionada actividad. La actividad de las enzimas está clasificada como degradativa de la leche y antibacteriana, principalmente. La actividad degradativa provocará modificaciones en las cualidades de la leche que pueden mermar el rendimiento tecnológico y las cualidades organolépticas (proteólisis y lipólisis, entre otras), mientras que la actividad antibacteriana aporta una protección limitada a la leche, evitando que sea degradada por las bacterias. Además, determinadas enzimas pueden ser empleadas como indicadores de calidad higiénica, de tratamiento térmico o de la especie animal.

La lisozima es una enzima lisosomal que juega un papel importante en el sistema inmunitario del hospedador ya que, junto con otros sistemas enzimáticos que no han sido completamente investigados, destruye las bacterias fagocitadas por los PMN al dañar las paredes bacterianas. Además, los PMN controlan la colonización del hospedador a través

de la excreción de gránulos secundarios que la contienen (Zecconi y Smith, 2003). Aunque la lisozima es una enzima lisosomal asociada a los leucocitos, ha sido aislada en el suero de la leche.

La catalasa es una enzima presente en todas las leches, que se encuentra ligada a la membrana del glóbulo graso, pero cuyo origen también puede ser bacteriano y leucocitario, por lo que es empleada como indicador de la calidad higiénico-sanitaria de la leche. Es una óxido-reductasa que descompone el peróxido de hidrógeno en agua y oxígeno gaseoso. Gracias a que su actividad aumenta a medida que aumenta el contenido en leucocitos, ya que es liberada por los mismos (Fox y Kelly, 2006), su determinación podría ser empleada como método de detección de mamitis. Su actividad también puede deberse a la presencia de ciertas bacterias que la segregan, por lo que para evitar una interpretación errónea del resultado, debe asegurarse la no contaminación de las muestras durante su manipulación. Kang *et al.* (2002) encontraron una elevada correlación ($r = 0,89$) entre la actividad de la enzima catalasa y elevados recuentos de aerobios mesófilos ($\log_{10} \text{ UFC/mL} > 4$), por lo que concluyeron que su empleo podía predecir la contaminación bacteriana de la leche. Debido a que la enzima está ligada al glóbulo graso, sus niveles serán mayores cuanto mayor sea esta variable en la leche.

La peroxidasa (o lactoperoxidasa) es una enzima presente en todas las leches, que también puede provenir de los leucocitos, siendo la responsable de la fase bacteriostática de las primeras horas tras el ordeño. Su actividad en presencia de peróxido de hidrógeno también va a provocar la liberación de oxígeno activo. Su concentración media en la leche es de 30 mg/L.

La lipasa presente en la leche es una enzima hidrolasa que actúa sobre la grasa (liberando ácidos grasos de los triglicéridos en emulsión) y cuyo origen puede ser el animal (mLPL: milk Lipo Protein-Lipasa), las bacterias (sobre todo psicrotrofas) y los leucocitos. Su actividad puede darse de manera espontánea o inducida por una acción mecánica o turbulencia de la leche. La primera es realizada por las enzimas localizadas en las membranas de los glóbulos grasos (presentes en menor proporción), mientras que la segunda es realizada por enzimas solubles, que durante el enfriamiento de la leche se localizan en la micela de caseína, conteniendo la leche unos valores de 1 a 2 mg/L en condiciones normales. La leche de animales mamíferos tiene una mayor actividad lipasa,

debido al mayor contenido en leucocitos que también presentan una enzima similar a la endógena de los animales (Morgan, 2000).

La actividad fosfatasa de la leche se debe a dos enzimas, una ácida (localizada en el lactosuero) y otra alcalina (localizada en la membrana del glóbulo graso y presente en mayor cantidad). Su actividad consiste en la hidrólisis de los ésteres del ácido fosfórico y se ve reducida tras la pasteurización, por lo que es empleada como medida de la eficacia del tratamiento térmico. En el calostro su proporción es elevada, reduciéndose los niveles tras el primer mes de lactación, para volver a aumentar al final de la lactación (fundamentalmente la alcalina). En leche de vaca libre de mamitis, Babaei *et al.* (2007) publicaron unos niveles de 34,9 UI/L, mientras que la presencia de mamitis subclínica incrementó los niveles hasta 136,2 UI/L (con CMT=3). En el mismo sentido, Morgan (2000) afirmó que su contenido aumentaba a medida que lo hacía el RCS en leche de cabra.

La lactoferrina se sintetiza por las células epiteliales de la glándula mamaria y por los PMN, teniendo propiedades antimicrobianas. Su actividad se basa en su afinidad por el ion hierro y capacidad de ligarse a las membranas microbianas y dispersar los lipopolisacáridos, provocando la muerte de la bacteria. Además, reduce la capacidad de adhesión de las bacterias a las células e interactúa con los receptores específicos de las células inmunitarias (Ward *et al.*, 2005). En ganado vacuno, Kawai *et al.* (1999) obtuvieron unos niveles significativamente mayores en leche procedente de animales con mamitis clínica (849 µg/mL) con respecto a mamitis subclínica (495 µg/mL) y libres de mamitis (169 µg/mL). En el mismo sentido, en ganado vacuno, Hagiwara *et al.* (2003) observaron una tendencia a incrementar la concentración de lactoferrina a medida que lo hacía el RCS, publicando un rango de 7-1150 µg/mL (media = 169,06 µg/mL) en animales libres de mamitis y de 7-3600 µg/mL en animales con mamitis subclínica.

La plasmina es la principal enzima proteolítica de la leche, siendo en realidad un sistema completo (plasmina, plasminógeno, activadores de plasminógeno e inactivadores de ambos) cuyo origen es la sangre. Los niveles incrementan durante la mamitis y la fase final de lactación, debido al aumento del flujo de componentes sanguíneo a la ubre. Una vez en la leche, se halla asociada a la micela de caseínas (siendo su principal sustrato la β -

caseína) mientras que los inhibidores se hallan en el suero lácteo (Fox y Kelly, 2006). En vacuno, su actividad aumenta con la mamitis (Schaar y Funke, 1986), tanto en leche de ubre (Logplasma=1,14 vs 1,27) como de glándula (Logplasma=1,24 vs 1,50) y con el estado de lactación y el número de lactación. En ganado caprino, Martí *et al.* (1999) registraron un incremento significativo del 21-23% de la actividad del enzima cuando el RCS era superior a 800.000 cel/mL.

La N-acetil-β-D-glucosaminidasa (NAGasa) es una enzima lisosomal cuyo principal origen son los lactocitos y, en menor medida, las células somáticas. La principal localización en las células epiteliales es el citosol, en la fracción soluble de la célula, al igual que ocurre en la leche donde se localiza en la fracción soluble (82% del contenido en leche; Kitchen *et al.*, 1978). Los daños en las membranas celulares provocados por la mamitis es el origen de que el enzima junto con parte del citoplasma, se difunda desde el citosol celular hacia el lumen alveolar, esto unido a la liberación del enzima por parte de los leucocitos, provoca un incremento de NAGasa en la leche de animales mamíticos (Kitchen *et al.*, 1978), encontrándose una elevada correlación ($r=0,8$) de esta enzima con el RCS (Le Mens *et al.*, 1996). Por ello, la medición de la actividad de esta enzima ha sido utilizada como método de diagnóstico indirecto de mamitis subclínicas. Piccinini *et al.* (2007) encontraron que, en ausencia de infección intramamaria, los patrones de evolución de NAGasa y RCS no estaban directamente relacionados, lo que sugería que en esas circunstancias las células somáticas no son la principal fuente de NAGasa.

Casi todas las publicaciones consultadas que han estudiado el efecto de la mamitis en el contenido de la enzima han encontrado una relación positiva, es decir, la infección de la glándula mamaria provoca el aumento de la concentración de la enzima en la leche. Por el contrario, Piccinini *et al.* (2007) no encontraron una relación significativa positiva con el RCS, ya que las glándulas con RCS entre 100.000 y 200.000 cel/mL tuvieron mayores niveles de NAGasa (39,81 U) que las de RCS > 200.000 cel/mL (33,88 U). Guliye *et al.* (2002), en leche de dromedario, tampoco encontraron un efecto significativo de la infección en los niveles de NAGasa, y lo atribuyeron a que posiblemente el empleo de un kit para ganado vacuno no fuera adecuado para la especie animal estudiada.

En ganado ovino, Moroni *et al.* (2001) encontraron diferencias significativas en el contenido del enzima entre muestras procedentes de glándulas sanas y muestras de glándulas infectadas con ECN, siendo al inicio de lactación de 15,62 nmol/mL min en las

sanas y 24,75 nmol/mL min en las infectadas, mientras que al final de lactación fue de 20,28 nmol/L min en las sanas y 45,30 nmol/L min en las infectadas. De manera similar, Leitner *et al.* (2001) encontraron valores de 17,1 U (0,855 μ mol/L min) en glándulas sanas, 67,4 U (3,37 μ mol/L min) en glándulas infectadas con ECN y 97,9 U (4,89 μ mol/L min) en glándulas infectadas con estreptococos. Un efecto similar de la infección, aunque con valores ligeramente superiores fueron encontrados por Leitner *et al.* (2003), encontrando en glándulas libres de infección 22,9 U (1,145 μ mol/L min) y 73,1 U en glándulas infectadas (3,655 μ mol/L min). En ganado ovino manchego, Roca *et al.* (2012) observaron un incremento significativo de la actividad del enzima tras el establecimiento de la infección intramamaria, que fue más acusado cuando la infección se estableció de forma bilateral que cuando esta cursó de forma unilateral. En las glándulas sanas de las ovejas que se infectaron de forma unilateral también registraron un leve incremento, pero no significativo, de la actividad del enzima tras producirse la infección en la glándula colateral.

El coeficiente de correlación entre NAGasa y RCS ha sido en la mayoría de los estudios significativo y positivo. Así, Kitchen *et al.* (1978) y Berning *et al.* (1992) obtuvieron en ganado vacuno unos coeficientes de correlación elevados de 0,86 y 0,70 respectivamente, este último calculado mediante el logaritmo natural de ambas variables. Sin embargo, Bansal *et al.* (2005) encontraron coeficientes de correlación más bajos, entre 0,44 y 0,50, según la fracción de leche tenida en cuenta (inicio ordeño y apurado, respectivamente). De manera similar, Fox *et al.* (1985) y Nagahata *et al.* (1987) encontraron una relación positiva, de forma que a medida que aumentaba el RCS en leche de animales con mamitis clínica, también lo hacía el contenido en NAGasa. Shuster *et al.* (1991) encontraron unos patrones de evolución de los contenidos en NAGasa y RCS en leche de glándulas inoculadas con endotoxina muy similares, de manera que la toxina provocó una gran elevación de ambas variables que rápidamente descendieron de forma paralela. En ganado ovino, Leitner *et al.* (2001) encontraron un coeficiente de correlación de 0,85 entre ambas variables, similar al obtenido por Roca *et al.* (2012), quienes obtuvieron un coeficiente de correlación de 0,83 cuando analizaron todos los datos en conjunto. Al estudiar la correlación de la NAGasa con el RCS en función del nivel de RCS, obtuvieron un coeficiente de correlación superior cuando el RCS > 500.000 cel/mL que para un RCS < 200.000 cel/mL ($r=0,81$ y $0,28$, respectivamente).

3. MÉTODOS DE DETECCIÓN DE MAMITIS.

Las mamitis clínicas son fácilmente detectables por el ganadero, ya que se produce una inflamación visible de la ubre o glándula afectada que puede ir acompañada de un enrojecimiento e incremento de la temperatura. También cambia la apariencia de la leche, cambia su color y viscosidad y en algunos casos pueden aparecer coágulos de sangre. Por el contrario, las mamitis subclínicas no se detectan a simple vista y es necesario recurrir a métodos de diagnóstico ya sean directos (cultivo bacteriológico) o indirectos (recuento de células somáticas entre otros, Martínez y Peris, 1998). En cualquier caso, los métodos de diagnóstico para mamitis han de ser económicos, fáciles de usar y con buena exactitud (Nielen *et al.*, 1993) si se persigue su implantación a nivel comercial. En general, el diagnóstico de la mamitis se debe realizar teniendo en cuenta la sintomatología y la evolución de ésta en el tiempo, pudiendo ser observada directamente en el animal o en las alteraciones y cambios que se puedan producir en determinadas variables de la leche (ver apartado 2.4.2.). Así mismo, se debe contemplar que, para algunas variables, pueden existir otras fuentes de variación distintas de la mamitis que las modifiquen (edad del animal, estado de lactación, estado fisiológico, nivel productivo...). Koehler *et al.* (2002) indicaron que la fiabilidad de la detección de mamitis ofrecida por los métodos individuales puede ser mejorada mediante el uso combinado de varios métodos de detección.

Cualquier método para el diagnóstico de una enfermedad debe tener una elevada sensibilidad y especificidad. La sensibilidad es la probabilidad de que una muestra positiva resulte diagnosticada como positiva. Así una sensibilidad del 60% indicaría que solamente el 60% de los animales con mamitis serían detectados por el método, mientras que el 40% restante de animales infectados no sería diagnosticado. La especificidad es la probabilidad de que un animal no enfermo sea diagnosticado como no enfermo. Una especificidad del 90% indicaría que el 10% de los casos sanos son clasificados como enfermos. Otras características relacionadas con lo anterior son el valor predictivo positivo y negativo. El valor predictivo positivo indica el porcentaje de los diagnósticos positivos que realmente lo son, es decir, es el número de animales enfermos detectados dividido por el número de diagnósticos positivos obtenidos (tanto los verdaderos como los falsos). En el caso del valor predictivo negativo es el porcentaje de diagnósticos negativos que realmente lo son, es decir, el número de animales sanos con diagnóstico negativo dividido por el número de

animales con diagnóstico negativo (tanto los verdaderos negativos como los animales enfermos que no han sido detectados: falsos negativos).

3.1. MÉTODOS DIRECTOS.

Los métodos directos persiguen la demostración de la presencia de microorganismos patógenos en la leche mamética (bacteriología, virología, síntomas clínicos e histopatología), por lo que permiten realizar los tratamientos terapéuticos específicos en función del germen implicado. Dentro de este grupo se encuentran el diagnóstico bacteriológico (identificación de gérmenes causantes de infección mediante cultivo bacteriológico de una muestra de leche) y el diagnóstico clínico (observación de síntomas en el animal).

La realización del diagnóstico microbiológico es de gran utilidad, ya que aporta información sobre la etiología y en consecuencia valiosa información epidemiológica. Sin embargo, el diagnóstico microbiológico es demasiado costoso para llevarlo a cabo de forma rutinaria en condiciones de campo; por ello se necesitan métodos de diagnóstico indirecto fiables y a bajo coste (Martínez y Peris, 1998).

3.2. PRINCIPALES MÉTODOS INDIRECTOS DE DETECCIÓN DE MAMITIS.

Los métodos indirectos se basan en la evaluación de la intensidad de la reacción inflamatoria (contenido celular, variaciones en la composición de la leche y diagnóstico serológico), es decir en la evaluación de distintas propiedades o moléculas de la leche que pueden verse modificadas con la infección. Estos métodos pueden ser de gran utilidad en caso de mastitis subclínicas, donde no existen evidencias clínicas de la existencia de la infección, y se pueden dividir en pruebas de laboratorio y pruebas rápidas realizadas in situ. Las pruebas de laboratorio se llevan a cabo mediante técnicas analíticas e instrumentales que tienen como objetivo cuantificar de forma indirecta el grado de infección. Para ello se evalúa la alteración que presenta la leche (tanto a nivel individual, como en la leche del tanque). También se emplean pruebas para identificar de forma indirecta los microorganismos principales causantes del proceso patológico con el fin de adoptar las medidas terapéuticas adecuadas.

3.2.1. California Mastitis Test (CMT):

La mamitis puede ser detectada mediante tests *in situ* que pueden ser utilizados por los ganaderos, y que requieren relativamente poca formación. Una de las más antiguas y mejor conocidas es el CMT (Schalm y Noorlander, 1957). Se basa en el principio de que la adición de un detergente que contiene bromocresol púrpura a una muestra con alto RCS provoca la lisis de éstas, liberando ácidos nucleicos y otros componentes provocando la formación de una consistente matriz gelatinosa proporcional al número de leucocitos. Sin embargo, la interpretación de los resultados es subjetiva, dando lugar a falsos positivos y falsos negativos.

3.2.2. Recuento de Células Somáticas (RCS):

Entre las técnicas de diagnóstico indirecto de mamitis subclínicas cabe destacar el RCS como prueba de laboratorio (Martínez y Peris, 1998). Cuando la glándula mamaria se infecta, la rápida afluencia de leucocitos polimorfonucleares provoca un aumento en el RCS. Dentro del RCS en la leche prevalecen dos poblaciones celulares: leucocitos y células epiteliales mamarias. Los primeros protegen contra las infecciones mamarias y se agrupan en macrófagos, linfocitos y polimorfonucleares (PMN). Las células epiteliales mamarias están presentes en menor cuantía en la leche. De modo general, en ganado vacuno, se considera por debajo del límite permisivo de inflamación cuando el RCS es inferior a 250.000 cel/mL. De manera normal, la mayor parte de las glándulas de las ubres poseen menos de 100.000 cel/mL (Blood *et al.*, 1992). Según De la Cruz *et al.* (1994), el umbral propuesto en ovejas de raza Manchega, para discriminar ovejas con mamitis subclínica, está en 250.000 cels/mL, por debajo de este valor se consideran sanas y si el valor es superior se consideran enfermas. En cambio, Arias *et al.* (2012) establecieron un umbral de 300.000 cel/mL para clasificar muestras individuales con alto o bajo RCS. Los valores obtenidos por Martí de Olives *et al.* (2013) en glándulas sanas pertenecientes a la misma raza, fueron inferiores a 71 cel/mL.

Leitner *et al.* (2001), en ovejas de raza Assaf, encontraron un RCS de $321 \pm 35 \times 10^3$ cel/mL al principio de la lactación en glándulas libres de infección intramamaria, siendo significativamente menor que el registrado en glándulas infectadas ($1.371 \pm 150 \times 10^3$ al principio de la lactación y de $2.129 \pm 374 \times 10^3$ cels/mL al final de la lactación) con distintas

especies de ECN. Este RCS fue mayor que el observado en ganado vacuno infectado por los mismos patógenos, por lo que el autor sugiere que la ubre de la oveja tiene una menor resistencia y una respuesta inmunológica mayor para este tipo de microorganismos.

Pero el RCS de la leche de oveja, se encuentra influenciado por una gran cantidad de factores no infecciosos (Gonzalo *et al.*, 1994, Paape *et al.*, 2001, Arias *et al.*, 2012). Gonzalo *et al.* (2002), en un trabajo realizado con ovejas de la raza Churra, observaron un efecto significativo del rebaño, el estado de lactación y el patógeno causante de la infección en el RCS, obteniendo un RCS de 77×10^3 cel/mL en animales sanos, y de 131×10^3 ; 1.841×10^3 y 1005×10^3 cel/mL en animales infectados por patógenos menores, patógenos mayores o ECN sensibles a la novobiocina, respectivamente. Arias *et al.* (2012), en un estudio realizado a lo largo en doce años en 156 ganaderías pertenecientes a la Asociación Nacional de Criadores de Ganado Ovino Selecto de raza Manchega (AGRAMA) encontraron que el RCS varía en función de la edad de la oveja, número de crías, el estado de lactación, la sesión de ordeño, e incluso en las distintas estaciones el año. En ganado caprino, Díaz *et al.* (2011) también registraron variaciones del RCS en función del estado de lactación, el número de parto, o la granja a la que pertenecen los animales. En un estudio posterior realizado también en cabras Murciano-Granadinas, los mismos autores registraron un incremento del RCS a medida que avanzaba el ordeño, obteniendo una sensibilidad del 85% y una especificidad del 65% aplicando un umbral de 300.000 cel/mL en la tercera fracción de ordeño, que se correspondía con la leche de apurado. (Romero *et al.*, 2012a). Las diferencias observadas en el RCS en función de la fracción de ordeño han sido observadas también en ganado vacuno (Bansal *et al.*, 2005; Lien *et al.*, 2005) y en ganado ovino (Peris *et al.*, 1991).

El incremento de células somáticas puede utilizarse como herramienta para el control sanitario de la ubre de forma rutinaria. Los principales métodos instrumentales para la medida del RCS en leche recomendados por la Federación Internacional de Lechería son el método Coulter, Fossomatic y NIR (infrarrojo cercano). El método Coulter es un contador electrónico de partículas que presenta el inconveniente de inducir a error en las muestras de leche de cabra, debido a que esta especie libera partículas citoplasmáticas de tamaño similar a las células somáticas y que este método confunde con éstas (Maisi, 1990). El método Fossomatic (método opto-fluoro-electrónico) se fundamenta en la tinción del ADN nuclear de las células somáticas con bromuro de etidio, formando un complejo que emite una fuerte fluorescencia roja cuando se somete a la luz azul, que es registrada por el

equipo. El análisis de la leche mediante el infrarrojo cercano (NIR) se ha utilizado para la detección de mastitis y para determinar la composición de la leche. Este método ha sufrido rápidos progresos en su tecnología y tiene un bajo coste. Un estudio para calibrar los sensores del NIR para medir RCS en ganado vacuno (Tsenkova *et al.*, 2006) indicó la alta exactitud de este método. Wiedemann y Wendl (2004) obtuvieron una sensibilidad del 55% para un umbral de 200.000 cel/mL y del 71% para un umbral de 500.000 cel/mL con una especificidad del 95%, combinando la reflexión espectral de la luz roja (620 -700nm) con la conductividad eléctrica (CE) de la leche. El uso de este método combinado supuso un incremento del 10% de sensibilidad sobre los resultados de los métodos por separado. Así mismo, la medida de las variables en las primeras fracciones de la leche de cada cuarterón era esencial para ambos métodos.

Existen en el mercado contadores portátiles de células en leche, que permiten el análisis de RCS en la misma explotación ganadera. Un ejemplo es el Lactoscan, que realiza el conteo por fluorescencia. El contador DCC de DeLaval está formado por un lector y unos viales en los que se introduce la muestra de leche a analizar (60µL) y que contienen el reactivo necesario, de forma que al entrar en contacto con la leche se produce la tinción del ADN nuclear, emitiendo una luz fluorescente de intensidad proporcional al número de células teñidas. Estos viales se introducen en el lector y éste traduce la señal fluorescente emitida en número de cel/mL. Gonzalo *et al.* (2006) evaluaron su comportamiento en leche de ganado ovino, encontrando que los resultados eran adecuados si la leche era diluida (1:1, ensayaron 3 diluyentes), pero los resultados del análisis directo de leche no fueron lo suficientemente precisos, debido a la elevada cantidad de sólidos presente en la leche de oveja, por lo que concluyeron que no era adecuado para su uso directo, pero que podía ser de utilidad si se empleaba la muestra diluida debido a que tiene un coste mucho menor que los aparatos de laboratorio, su mayor rapidez de análisis y de obtención de resultados para el ganadero y el bajo volumen de muestra necesario.

En la actualidad, se comercializan equipos capaces de analizar automáticamente el RCS en ganado vacuno al mismo tiempo que las glándulas son ordeñadas. Es el caso del contador de células OCC de DeLaval para robots de ordeño VMS, cuyo funcionamiento es similar al contador de células DeLaval DCC.

3.2.3. Variaciones en la composición de la leche.

El estudio de algunos componentes de la leche, como son la lactosa y algunos iones, sodio y cloro principalmente, pueden ayudar a la identificación indirecta de la existencia o no de mastitis, debido al efecto que la infección intramamaria tiene en su concentración en la leche (Ver apartado 2.4.2).

La lactosa puede ser identificada bien por los métodos oficiales (método oficial de la Cloramina-T) o mediante métodos instrumentales (espectrofotómetros de infrarrojo cercano o medio).

Los cloruros se pueden determinar mediante pruebas muy específicas como la de Jacquot y Leniz o la de Volhardt, o Mohr, o por medio de electrodos selectivos (Díaz *et al.*, 2003). Zafalon *et al.* (2005) estudiaron la sensibilidad que tenía la medición del contenido en cloruros en leche para la detección de mastitis subclínica en ganado vacuno. Emplearon como umbral de discriminación un contenido superior al 16% de cloruros (determinado mediante la valoración volumétrica del punto de viraje con nitrato de plata, utilizando dicromato potásico) y obtuvieron unos resultados de sensibilidad y especificidad del 68,2% y 77,7%, respectivamente para muestras infectadas con *S. aureus* y del 78,3% y 63,6%, respectivamente, para muestras infectadas con corinebacterias.

La cuantificación del contenido en sodio y potasio en leche puede ser un indicador del estado sanitario de la glándula mamaria debido a los cambios que la mastitis provoca en la relación Na^+/K^+ . En este sentido, Díaz *et al.* (2012) registraron un incremento significativo del ratio Na^+/K^+ en leche cabras con infección bilateral. Basándose en los cambios que la mastitis provoca en el contenido iónico de la leche, Mottram *et al.* (2007) evaluaron un sensor basado en una matriz química, denominado “*Electronic tongue*” (lengua electrónica), que era capaz de detectar iones cloruro, potasio y sodio liberados durante la mastitis, además de cationes y aniones orgánicos e inorgánicos. Con este sensor podría obtenerse una especificidad del 96% y una sensibilidad del 93%.

3.2.4. Variaciones en el pH de la leche.

La leche en condiciones normales tiene un pH que oscila entre 6,5 y 6,8, tendiendo a la alcalinidad cuando es alterada por procesos mamíticos ($\text{pH}>6,8$). Estas variaciones de pH pueden ser detectadas, a nivel de campo, mediante la utilización de tiras de papel

indicador o discos impregnados de indicador. Esta prueba es orientativa, ya que son muchos los factores ajenos al proceso mamítico que pueden alterar el pH normal de la leche, como el estado fisiológico, restos de antibióticos, etc.

En ganado vacuno, Holdaway *et al.* (1996) encontraron un incremento significativo del pH debido a la infección intramamaria, en las distintas fracciones de leche estudiadas. También encontraron un efecto significativo de la fracción analizada, siendo el pH mayor en las fracciones de apurado que en los primeros chorros. Romero *et al.* (2010) clasificaron muestras de leche de cabras Murciano-Granadinas para la elaboración de queso fresco en función de su CE. El pH se incrementó de forma significativa cuando la CE fue mayor de 6,2 mS/cm. Este incremento del pH y de la CE también fue acompañado de un incremento del RCS. En ovino, Muelas *et al.* (1996) encontraron solamente diferencias significativas en el pH (entre glándulas sanas y mamíticas), cuando el RCS era superior a 1×10^7 cel/mL. Fragkou *et al.* (2008) observaron un incremento del pH de la leche transcurridas 8h, alcanzando el pH máximo (7,20) a las 12h de la inoculación de las glándulas con *Mannheimia haemolytica*, mientras en las glándulas control el pH fue inferior a 7.

3.2.5. Proteínas de la Fase Aguda (PFA).

Este método consiste en la determinación de ciertas proteínas séricas cuya concentración varía en la leche, principalmente por el incremento de la permeabilidad vascular de la barrera mamaria de los alvéolos que sucede durante el proceso mamítico. Las PFA son producidas por los hepatocitos de los mamíferos como respuesta inespecífica a una infección, traumatismo o enfermedad, actuando de forma rápida antes de que se desarrolle la inmunidad específica. En general, las PFA incrementan sus niveles en la sangre con el proceso inflamatorio (PFA positivas), aunque algunas pueden descender (PFA negativas). La producción de PFA es inducida por las citoquinas (liberadas por los leucocitos), como parte del funcionamiento de los mecanismos de defensa y reparación del organismo. Entre sus funciones están la de opsonización de bacterias, activación del complemento, y un efecto quimiotáctico sobre los leucocitos, entre otros. Las principales PFA usadas para la supervisión de la salud animal, y especialmente de la mamitis, son: Haptoglobina, Amiloide-A sérico y Proteína C-Reactiva, pues presentan un incremento más pronunciado y más rápido en la mayoría de especies. La albúmina también ha sido estudiada para la detección de mamitis, aunque no está claro si la inflamación provoca su

incremento o lo contrario. Los métodos de determinación de las PFA pueden clasificarse en colorimétricos e inmunológicos. Los primeros se basan en el cambio de color que algunas PFA producen en algunos sustratos debido a su actividad enzimática. Los segundos se basan en las reacciones antígeno-anticuerpo, empleando para ello un antisuero, que en ocasiones no es específico de la especie animal, incluso se emplean algunos diseñados para medicina humana.

La síntesis del Amiloide-A sérico puede ser provocada por diversos estímulos, siendo estimulada por las citoquinas interleukina-1 e interleukina-6 (Alsemgeest *et al.*, 1995) y posteriormente vertido al plasma sanguíneo. Su síntesis se realiza principalmente en el hígado, aunque han sido descritos otros tejidos como sintetizadores, entre ellos las células epiteliales mamarias (McDonald *et al.*, 2001). La evaluación de esta proteína para la detección de mamitis se ha enfocado en ganado vacuno hacia su análisis en leche. Esta PFA ayuda a provocar una respuesta del sistema inmunitario ante una infección, daño físico u otro tipo de estrés, presentando la ventaja de que sus niveles aumentan de forma más rápida que el RCS, por lo que puede ser útil como método de detección temprana de mamitis (Whyte *et al.*, 2004). Grönlund *et al.* (2003) observaron que el Amiloide-A incrementaba tras la inducción de una infección aguda con *S. aureus* tanto en la leche de las glándulas infectadas (61,8 mg/L) con respecto a las sanas (1,0 mg/L), como en el suero de los animales infectados (376,9 mg/L) respecto al de los sanos (2,82 mg/L) para descender a niveles previos a la infección cuando la infección se hacía crónica. Nielsen *et al.* (2004) al comparar los niveles de Amiloide-A sérico en leche y suero en vacas sanas, con mamitis y con inflamación no mamaria encontraron que la mamitis provocaba un incremento de esta proteína tanto en la leche como en el suero sanguíneo. Así mismo, observaron que para producir un incremento en la leche debía existir un patógeno en la glándula mamaria, y que debido a su relación con el RCS el contenido en leche del Amiloide-A puede ser un indicador de la severidad de la infección. De manera similar, O'Mahony *et al.* (2006) encontraron una elevada relación del Amiloide-A de la leche con el RCS (0,740 y 0,758), tanto para animales con niveles de Amiloide-A en suero altos como bajos (inferiores o superiores a 10.000 ng/mL, respectivamente). Además, propusieron un umbral conjunto de RCS superior a 150.000 cel/mL y concentración en leche de Amiloide-A superior a 800 ng/mL para la detección de mamitis, encontrando una sensibilidad y especificidad muy elevadas (79,3-81,6% y 69,7-58,6%, respectivamente). Sin embargo, observaron que en los casos en los que el contenido en sangre era elevado,

también lo era en la leche, pero no sucedía así con el RCS, concluyendo que existía la posibilidad de que el Amiloide-A de la leche provenga mayoritariamente del flujo sanguíneo y que el RCS puede no elevarse en algunos casos de mamitis subclínica. Kalmus *et al.* (2013) observaron un incremento del Amiloide-A en muestras en las que se identificó ADN de *E. coli* o *Streptococcus dysgalaxia* por PCR. En cambio en las muestras en las que se identificó ADN de *Corynebacterium bovis* o SCN, registraron una concentración menor de Amiloide-A comparada con la registrada en muestras en las que estas especies no fueron identificadas.

En el caso de la haptoglobina, Grönlund *et al.* (2003) observaron que incrementaba tras la inducción de una infección aguda con *S. aureus* en el suero sanguíneo de las vacas infectadas (945,5 vs. 52,5 mg/L, respectivamente) para descender a niveles previos a la infección cuando la infección se hacía crónica (83,2 mg/L). Sin embargo, en el caso de la leche no observaron diferencias significativas, aunque sí una tendencia a aumentar en las glándulas con infección aguda (40,3 mg/L) con respecto al resto (sanas y con infección crónica). Nielsen *et al.* (2004) encontraron que en presencia de mamitis, se elevaba su concentración en suero sanguíneo y en leche. Así, en leche la concentración se elevaba a medida que lo hacía el RCS, por lo que puede ser un buen indicador de la severidad de la infección. Kalmus *et al.* (2013) concluyeron que la concentración de haptoglobina está relacionada con la presencia de ADN de agentes patógenos en leche.

3.2.6. Determinación de la enzima N-acetyl-β-D-glucosaminidasa (NAGasa).

Como se ha visto en el apartado 2.4.2, la infección intramamaria provoca un incremento de la NAGasa, por lo que su medida puede ser un buen indicador de mamitis. Pyörala (2003) va más allá, proponiendo su cuantificación como un parámetro para el seguimiento de mamitis subclínica, junto con la conductividad eléctrica y la lactosa, en vez del RCS.

Welbeck *et al.* (2011) desarrollaron un biosensor para su determinación en leche, con el que obtuvieron un límite de detección de 1 µg/mL, aunque los autores concluían que eran necesarios más estudios porque los niveles en leche de NAGasa tanto en vacas sanas como enfermas fueron superiores a la capacidad de detección del biosensor.

3.2.7. Medida de la Conductividad Eléctrica (CE) de la leche.

La determinación de la CE en la leche es considerado como el método indirecto de diagnóstico de infecciones intramamarias de mayor aplicación práctica en las explotaciones de ganado vacuno, pues, a diferencia del RCS y del CMT, puede automatizarse a nivel de la máquina de ordeño (Nielen *et al.*, 1992). Dado que es la variable objeto de estudio en esta Tesis se desarrolla ampliamente en el siguiente apartado.

4. LA MEDIDA DE LA CONDUCTIVIDAD ELÉCTRICA COMO MÉTODO DE DETECCIÓN DE MAMITIS. FACTORES DE VARIACIÓN.

La conductividad eléctrica (CE) es la medida de la capacidad de un material o de una solución en particular para conducir la corriente eléctrica, y depende, por tanto, de la naturaleza del material y de la concentración y movilidad de los iones de las soluciones, siendo la unidad de medida los mili Siemens por centímetro (mS/cm). La CE de la leche depende en más del 60% de su contenido en sales disueltas, de la naturaleza de las mismas y sus interacciones (Schulz y Sydow, 1957), de este modo, los constituyentes de la leche (grasa, proteína y lactosa) ejercen una influencia moderada, si se compara con las sales inorgánicas (Ruegg *et al.*, 1980). La capacidad de la CE para la detección de mamitis se basa en que cuando la glándula mamaria se inflama, la barrera sangre-leche se rompe destruyendo los sistemas activos de bomba de iones que pierden su permeabilidad y crean compuestos en el fluido extracelular, tales como iones cloruro, sodio, hidrógeno, potasio e hidróxido, para entrar en la glándula y mezclarse con la leche (Zhao y Lacasse, 2008). Ésta pérdida de la permeabilidad capilar de la sangre da como resultado un cambio en la concentración de diversos componentes de la leche.

Dado que el tejido secretor está dotado de diversos sistemas que ayudan a mantener la diferencia de concentración de iones (principalmente Na^+ , Cl^- y K^+) que existe entre la sangre y la leche y que la leche es iso-osmótica con la sangre, las células secretoras de la glándula mamaria estabilizarán la presión osmótica (Linzell y Peaker, 1971). Los sistemas de transportes activos y pasivos en las células secretoras de la glándula mamaria mantienen la relación Na^+/K^+ en la leche de aproximadamente 1:3, mientras que es 30:1 en el fluido extracelular o en la sangre. Hamann y Zecconi (1998) encontraron que la mamitis provoca

una modificación en los componentes mayoritarios de la leche: calcio, fósforo y potasio disminuyeron, aumentando la concentración de sodio y cloruros.

La CE de la leche en vacas se encuentra normalmente entre 4,0 y 6,0 mS/cm, aunque se ha constatado que en animales afectados por mamitis clínica y subclínica es mayor que en animales sanos (Nielen *et al.*, 1992; Hamann y Zecconi, 1998; Norberg *et al.*, 2004a) ya que la leche de glándulas infectadas es mejor conductora de la corriente eléctrica debido al incremento de los iones Na^+ y Cl^- y a la reducción en el contenido de iones K^+ y lactosa (Kitchen, 1981).

En ovino los valores de CE suelen variar entre 2,6 y 7,6 mS/cm (Mólnar y Kukovics, 1993). Caria *et al.* (2016) registraron una CE media de 4,73 mS/cm en ovejas Sarda, afirmando que este valor fue superior a los registrados por Serra *et al.* (1997) en ovejas de la misma raza. Peris *et al.* (1989) encontraron en ovejas Manchegas libres de mamitis un valor medio de 4,4 mS/cm, y unos valores extremos entre 9,5-10,5 mS/cm en la leche procedente de animales con infección intramamaria. Peris *et al.* (1989), propusieron dos umbrales para la detección de mamitis. Uno de ellos, consistía en que una glándula era diagnosticada como mamítica si superaba el umbral absoluto de 5 mS/cm, con ello encontraron una sensibilidad del 60,2% y una especificidad del 91,4%, con un porcentaje de muestras clasificadas correctamente del 87,9%. El otro umbral consistía en que la diferencia de CE entre las dos glándulas del mismo animal fuese superior a 0,3 mS/cm, encontrando mejores resultados que con el anterior (70% de sensibilidad, 93 % de especificidad y 89,1 % de muestras clasificadas correctamente).

La medida de la CE en leche se ve afectada por diversos factores, tales como la temperatura, el contenido en grasa o la fracción de la leche (Peris *et al.*, 1991, Romero *et al.*, 2012), la raza (Hamman y Zecconi, 1998), los partos (Sheldrake *et al.*, 1983), el estado y número de lactación (Scharch *et al.*, 2000; Norberg *et al.*, 2004b; Díaz *et al.*, 2011), el intervalo entre ordeños (Fernando y Spahr, 1983), la composición (Park, 1991; Das y Singh, 2000; Mabruk y Petty, 2003; Díaz *et al.*, 2011) los cambios fisiológicos y los factores relacionados con la condición general del animal, como por ejemplo el estro (Norberg, 2005; Sloth y Løvendahl, 2004; Olechnowicz y Jaśkowski, 2014). Estos factores pueden clasificarse en intrínsecos (aquellos que dependen directamente del animal) o extrínsecos, (los afectados por el manejo o circunstancias ajenas a la fisiología del animal).

4.1. FACTORES INTRÍNSECOS AL ANIMAL.

4.1.1. El propio animal.

Una propiedad que resulta beneficiosa para distinguir anomalías en la ubre es la poca variabilidad en la CE de la leche de las glándulas de un mismo animal en condiciones fisiológicas, tal como indicaron varios autores (Hillerton y Walton, 1991; Shoshani y Berman, 1998). Según Hamann y Zecconi (1998), en ganado vacuno no existen diferencias significativas en el RCS ni en la CE de la leche de glándulas libres de infección del mismo animal, siendo similar la CE en las glándulas colaterales. Este aspecto ha sido corroborado en caprino (Fernandes, 2002; Díaz *et al.*, 2012). Es por esto que la lectura de la CE en glándulas y, particularmente, la diferencia entre colaterales y/o el historial de cada glándula, han sido empleadas entre otras variables, en los algoritmos de cálculo para la detección de mamitis en diversos estudios publicados.

Hillerton y Walton (1991) y Zecconi *et al.* (2004) observaron un efecto significativo de la granja en la CE de vacas de la misma raza, al igual que Díaz *et al.* (2011) en ganado caprino. Shoshani y Berman (1998) encontraron que la mayor fuente de variación en la CE en rebaños manejados de forma similar era la diferencia entre animales. En este sentido, la mayoría de algoritmos estudiados para la detección automática de mamitis, introducen también el historial de CE de las glándulas del animal, no realizándose comparación con el resto de animales.

4.1.2. Raza.

La variabilidad genética entre razas es amplia, de modo que factores como la producción, composición de la leche, resistencia a enfermedades, etc., pueden afectar a la lectura de la CE (Hamann y Zecconi, 1998).

Park (1991) encontró diferencias en la CE entre las razas de cabras Alpinas (francesas) y Nubianas (inglesas), siendo mayor en las primeras, además coincidió que estos animales tenían un menor contenido en grasa y proteína. Del mismo modo, Fernandes (2002) también encontró diferencias entre cabras Alpinas (6,71 mS/cm) y Saanen (6,55 mS/cm) criadas en Sao Paulo, diferencias que también justificó por el contenido en grasa (2,64 3,30 g/dL respectivamente), al igual que Das y Singh (2000),

quienes también encontraron diferencias entre dos grupos de cabras cruzadas (Alpine×Beetal y Saanen×Beetal).

4.1.3. Estado de lactación.

Existen diversos factores fisiológicos que afectan a la regulación de la actividad secretora de la leche a lo largo de la lactación. Las alteraciones hormonales, la disminución de la presión intramamaria, la capacidad de circulación de la sangre y la reducción de la estanqueidad del epitelio secretor debido a los cambios en las uniones impermeables entre células, son las principales causas de los cambios en la composición durante la lactación. Sin embargo, la presión osmótica mantiene un balance constante de sales (Hamann y Zecconi, 1998). Debido a las alteraciones producidas en las uniones impermeables, se producen cambios significativos en la concentración de sales al principio y final de la lactación. Durante el periodo de secreción de inmunoglobulinas, las bombas de sodio de las membranas basolaterales pueden transportar a éstas a las membranas lumbales. Las bombas de sodio, además, transportan el sodio a la leche y potasio al fluido intracelular, contribuyendo a una mayor CE. Además, al final de la gestación, previamente al estro y/o durante tratamientos con oxitocina, la barrera entre células que separa el intersticio y la leche se debilita, abriendo un camino “paracelular” para la difusión pasiva de iones sodio y cloruro hacia la leche a favor de gradiente de concentración, aumentando su CE (Linzell y Peaker, 1971). Al principio de la lactación, las concentraciones medias de caseínas, Ca^{2+} y Mg^{2+} total soluble, Ca^{2+} libre, el citrato total y soluble, el Na^+ total y el Cl^- total son altos, mientras que la lactosa y el pH de la leche son más bajos comparados con los valores en mitad de la lactación. Al final de la lactación el Na^+ total, Cl^- y el pH de la leche son altos pero la concentración total de K^+ es baja comparado con los valores a mitad de la lactación (Hamann y Zecconi, 1998).

En leche de oveja, Mólnar y Kukovics (1993) no encontraron cambios significativos en la CE a medida que avanzaba la lactación. Das y Singh (2000) observaron una disminución de la CE en leche de cabra hasta la cuarta semana de lactación, a partir de la cual se producía un aumento. Fernandes (2002) encontró los valores más altos de CE en el segundo trimestre de lactación, coincidiendo con una mayor producción y los niveles más bajos de grasa. Ying *et al.* (2002) encontraron que la CE aumentaban a medida que avanzaba la lactación. En cabras Murciano-Granadinas, Díaz *et al.* (2011), registraron un

aumento paulatino de la CE hasta el 5 mes de lactación, y luego descendió ligeramente, para volver a aumentar de nuevo en el séptimo mes. En vacuno, Rajala-Schulz *et al.* (1999) también observaron un aumento de la CE a medida que avanzaba la lactación. Holdaway *et al.* (1996) encontraron un incremento hasta el cuarto mes, para descender a partir de ahí y volver a aumentar al final. Norberg *et al.* (2004b) encontraron un valor elevado al inicio que disminuyó de forma rápida durante los primeros 50 días para, a continuación, aumentar levemente hasta el final. A diferencia de los anteriores, Maatje *et al.* (1992) a medida que la lactación avanzaba, encontraron un continuo nivel decreciente de la CE de la leche en glándulas sanas.

4.1.4. Celo.

El estro y las enfermedades sistémicas son factores del estado fisiológico del animal que influyen en la CE (Linzell *et al.*, 1974). El celo puede provocar un aumento de la actividad, de la temperatura, y un descenso en la producción y en la ingestión. De igual manera, la mamitis puede producir un aumento de la CE, la temperatura y una disminución en la producción de las glándulas afectadas (Maatje *et al.*, 1997).

El efecto de la mamitis puede diferenciarse del efecto del celo, pues éste afecta a todas las glándulas por igual, mientras que la mamitis podría afectar a una o a varias glándulas por separado. Así, un modo de diferenciar si el aumento en la CE se debe al celo o a la mamitis es, por un lado, mediante la comparación de datos procedentes de glándulas individuales respecto a sus colaterales; y por otro, el estudio de la evolución histórica, siendo ambos utilizados en algunos de los algoritmos de cálculo de los sistemas automáticos de detección, ya que la mamitis afecta generalmente a 1 ó 2 cuarterones y raramente se produce en los cuatro a la vez (Maatje *et al.*, 1992). En este sentido, Lansberger *et al.* (1994) indicaron que vacas en las que se detectó un incremento de la CE de la leche en las cuatro glándulas, o estaban en estro (temperatura elevada en el momento de la lectura de CE) o tenían una glándula con mamitis clínica que afectaba a sus colaterales. Por ello, la combinación de la lectura automática y procesado de la CE, junto con la temperatura y producción de leche permitió detectar y tratar mamitis severas (Maatje *et al.*, 1992). Por otro lado, la detección del celo, mediante otros métodos, por ejemplo la utilización de podómetros (sensores que detectan la actividad física del animal), es una herramienta útil para comprobar si la elevación de CE de la leche se debe al estro.

4.1.5. Número de lactación.

El efecto de la edad del animal, y concretamente el número de lactación, en la lectura de la CE de la leche varía en función del estudio considerado. En vacuno Holdaway *et al.* (1996) observaron que la CE aumentó significativamente con la edad del animal en uno de los rebaños estudiados, mientras que en otro no tuvo un efecto significativo. Zecconi *et al.* (2004) también encontraron un efecto significativo en el número de lactación (primíparas frente a multíparas). Díaz *et al.* (2011) registraron una CE similar entre cabras primíparas y multíparas al inicio de la lactación, pero la evolución de la variable fue distinta a medida que avanzó la lactación; mientras que en cabras primíparas la CE osciló en torno a los 5,4 mS/cm a lo largo de toda la lactación, en multíparas observaron un incremento significativo de la variables a partir del tercer mes, registrando una CE de 6,03 mS/cm al final de la lactación. Romero *et al.* (2012a) también registraron una CE significativamente superior en cabras multíparas (5,45 mS/cm) con respecto a las primíparas (5,07 mS/cm). Por el contrario, Fernandes (2002) indicó que la CE en leche de cabra tiende a disminuir a medida que aumenta el número de lactación. En primera lactación la CE fue de 6,54 mS/cm y el contenido en grasa de 2,59 g/dL, mientras que en 5ª lactación la CE fue menor (6,48 mS/cm) y el contenido en grasa mayor (3,75 g/dL).

4.1.6. Composición de la leche.

- **Grasa.**

Uno de los factores que más afectan a la medida de la CE es la concentración de grasa en leche. El modelo conceptual que explica esta afección, es el de esferas aislantes empotradas en un medio conductor que reduce, junto con otros sólidos en la leche, la sección a medir. Por tanto, la grasa modula la medida de la conductividad del electrolito base y contribuye a cambios en las medidas de CE durante el ordeño (Linzell *et al.*, 1974). En segundo lugar, los glóbulos de grasa, incrementan la distancia real en la migración de iones que tienden a cruzarse entre los dos electrodos (Prentice, 1962), no existiendo relación entre el tamaño del glóbulo graso y la CE. Prentice (1962) también indicó que la presencia de grasa reduce la CE proporcionalmente al 1,5% de “fuerza” iónica de la

fracción de volumen de grasa libre presente. Mucchetti *et al.* (1994) concluyen que la grasa disminuye la CE en leche en un 10% de su valor.

Mólnar y Kukovics (1993) no encontraron relación entre la CE y el contenido de grasa en ovino. Sin embargo, Caria *et al.* (2016) obtuvieron una correlación negativa y significativa entre ambas variables ($r = -0,216$) en ovejas Sardas, de acuerdo con lo expuesto por Peris *et al.* (1989), quienes afirmaron que, al estar la CE correlacionada negativamente con el contenido graso, la lectura de la misma variará dependiendo de la fracción de leche empleada. Así, en leche de repaso manual, con un contenido en grasa mayor que la leche máquina o primeros chorros, la CE será menor. Lien y Wan (2000) y Bansal *et al.* (2005) también obtuvieron en vacas un porcentaje de grasa en la fracción de leche apurado significativamente mayor al porcentaje de leche máquina. Hillerton y Walton (1991) observaron que los niveles de CE anormalmente altos en los cuatro cuartos de algunos animales, en ausencia de infección, eran debidos a anomalías individuales en la composición de la leche, especialmente por un bajo contenido en grasa.

Los resultados encontrados en leche de cabra son diversos, y en algunos casos contradictorios. Park (1991) encontró una correlación negativa y significativa $r = -0,59$ entre la CE y el porcentaje de grasa, también Ying *et al.* (2004) observaron una correlación negativa en dos razas de caprino, siendo $r = -0,529$ para la raza Saanen y $r = -0,774$ para la Alpina. Díaz *et al.* (2011), también registraron una relación negativa entre el contenido graso de la leche y la CE aunque de bajo valor ($R^2_{\text{parcial}} = -0,01455$). Por el contrario, Das y Singh (2000) encontraron una correlación positiva entre el contenido en grasa y la CE en leche de vaca.

- **Proteína.**

La proteína impide la migración de iones, y por tanto afecta a la lectura de la CE, de forma similar a como lo hace la grasa. Woolford *et al.* (1998) así como Das y Singh (2000) en vacuno no encontraron correlaciones significativas entre el porcentaje de proteína y la CE. Por el contrario, en caprino Park (1991) encontró una correlación negativa significativa entre la proteína y la CE ($r = -0,62$). Ying *et al.* (2004) en función de la raza caprina estudiada, encontraron distintas correlaciones según la raza: positiva para Saanen ($r = 0,288$) y negativa Alpina ($r = -0,285$). Fernandes (2002) encontró una correlación significativa y negativa ($r = -0,284$) entre la CE y la proteína.

- **Lactosa.**

La lactosa es el componente lácteo más importante en la regulación de la presión osmótica de la leche; y su contenido, para una misma presión osmótica, es inversamente proporcional a la concentración del ión cloruro (Hamann y Zeconni, 1998). El descenso en la síntesis de lactosa debido a la mastitis, junto al de potasio, provoca el aumento de las concentraciones de los iones sodio y cloruro con la finalidad de mantener la presión osmótica adecuada, cuyo paso al lumen se ve favorecido por el deterioro de las membranas de las células epiteliales de la glándula mamaria.

En ganado vacuno, Bansal *et al.* (2005) encontraron una correlación elevada y negativa entre la lactosa y la CE variando entre $-0,62$ y $-0,66$ según la fracción estudiada. Fernandes (2002) encontró una correlación altamente significativa y negativa entre la CE y la lactosa ($r = -0,741$) en caprino. Ying *et al.* (2004) encontraron menores correlaciones negativas en la raza Saanen ($-0,280$) y en la Alpina ($-0,239$). Ferrero *et al.* (2014) observaron una dependencia de la CE con la lactosa, ajustando la siguiente ecuación: $y = -0.551x + 7,6661$, en la que la variable dependiente (y) era la CE de la leche y la variable independiente (x) fue la lactosa, obteniendo un alto coeficiente de regresión $R^2 = 0,8854$.

En ganado ovino, Mólnar y Kukovics (1993) no encontraron relación entre la CE y la lactosa, la cual permaneció prácticamente constante a lo largo de la lactación. Das y Singh (2000) observaron en cabras una relación inversa en la evolución de la CE y el contenido de lactosa en leche. De acuerdo con estos trabajos, y también en ganado caprino, Díaz *et al.* (2011) observaron una relación inversa entre la lactosa y la CE, obteniendo una $R^2_{\text{parcial}} = 0,0299$ cuando solo tuvieron en cuenta la macrocomposición de la leche. Al tener en cuenta en el modelo el contenido mineral de la leche, la lactosa no mostró un efecto significativo en las variaciones de la CE, siendo el cloruro y el sodio los principales componentes.

- **Ácido láctico.**

El ácido láctico y las sales son importantes conductores, por lo que su presencia hace que se incremente la CE. Sin embargo, la adición del ácido láctico en leche produce cambios en el equilibrio de sales (tanto solubles como coloidales) causando, en segunda

instancia, una disminución de la CE. Una vez estabilizado el proceso, la CE aumenta de forma leve. Esto es debido a que la leche tiene otras muchas sustancias solubles, algunas de las cuales son conductoras, que incrementan la fuerza iónica y viscosidad de la solución ante una bajada de pH, interfiriendo con las sales y disminuyendo, de este modo, su potencial conductor. Estos procesos son denominados “sistemas amortiguadores citrato y fosfato” y están presentes de forma natural en la leche. Este tipo de sistemas amortiguadores están compuestos de iones lactato, que contribuyen de forma positiva aumentando la CE; y de iones fosfato, que lo hacen de forma negativa, disminuyéndola. El empleo de los cambios en la CE para observar el desarrollo de bacterias productoras de ácido láctico en leche, permite una evaluación global en la evolución del estado de diferentes “componentes de carga” durante la acidificación de la leche (Mucchetti *et al.*, 1994).

- **Iones.**

El tipo y cantidad de iones presentes en la leche juegan un papel importante en la CE. Las sales inorgánicas disociadas son los principales componentes que afectan a la CE, de forma que más de un 60% de la variación de la CE es debida a los iones cloro, sodio y potasio (Hamann y Zeconi, 1998). Además, según Puri y Parkash (1963) existe una relación lineal entre la CE y la concentración del ión cloruro. En ganado caprino, Díaz *et al.* (2011) observaron que el mayor responsable de los cambios registrados en la CE de la leche fue el ión cloruro, con una $R^2_{\text{parcial}} = 0,7796$; cuando la R^2 del modelo fue de 0,91. Fernandes (2002) encontró una elevada correlación positiva ($r=0,60$) entre la CE de la leche de cabra y el contenido en cloruros, coincidiendo con lo obtenido por Fernando *et al.* (1985) en leche de vaca ($r=0,84$). Fernando *et al.* (1985), en ganado vacuno, obtuvieron una correlación elevada de la CE con el ión Na^+ ($r = 0,84$), y moderada y negativa con el K^+ ($r = -0,37$). En ganado caprino, Ying *et al.* (2004) obtuvieron una correlación más baja de la CE con el ión Na^+ (0,366 en Saanen, y no significativa en Alpina) y una correlación positiva de la CE con el K^+ , también variable en función de la raza ($r=0,199$ en la raza Saanen, y $r=0,629$ en la Alpina).

Debido a que la leche es iso-osmótica con la sangre, la CE puede variar con los mecanismos de secreción tratando de estabilizar el balance osmótico, como ocurre con la

secreción de lactosa, de este modo la CE se incrementa cuando aumenta el contenido iónico (Fernando *et al.*, 1985).

4.2. FACTORES EXTRÍNSECOS.

4.2.1. Alimentación.

En particular, la concentración de proteína y grasa en leche está influenciada por la alimentación y podría causar cambios en la CE de la leche, independientemente del estado sanitario de las glándulas (Ruegg *et al.*, 1980). Sin embargo, Schams (1985), citado por Hamann y Zeconi (1998), indica que no existe una relación directa entre la alimentación y la CE ya que ésta no tiene efectos obvios en la concentración de iones y lactosa en leche, por lo que no hay una relación directa entre alimentación y CE.

4.2.2. Intervalo entre ordeños.

El intervalo entre ordeños puede llegar a variar en algunas horas para un mismo animal, dependiendo de la frecuencia de ordeño, tamaño o manejo del rebaño. Diferentes intervalos pueden influir sobre la composición de la leche, y por lo tanto sobre la CE, esto cobra mayor importancia en los sistemas automáticos donde el intervalo puede ser muy variable, debido a que los animales acuden voluntariamente al box de ordeño.

Fernando *et al.* (1985) encontraron un efecto significativo del intervalo de ordeño sobre la CE, los contenidos en cloro, sodio, potasio, lactosa y células somáticas para todas las glándulas tanto infectadas como sanas, en vacuno. Los mayores valores de CE, cloruro, sodio y RCS fueron encontrados para intervalos entre ordeños de 3 horas, estos valores fueron más bajos que con intervalos de 9 horas, incrementándose posteriormente a medida que se elevaba el intervalo hasta 15 horas. Estos resultados son similares a los obtenidos por Biggadike *et al.* (2002) quienes encontraron un efecto significativo del intervalo entre ordeños con la CE de la leche glandular, y los de Hillerton y Walton (1991) que observaron una mayor CE para intervalos de 15,5 horas respecto a 8,5 horas (5,4 frente a 5,1 mS/cm, respectivamente). Barth y Worstorff (2000) encontraron que los intervalos entre ordeños de 12 horas provocaban lecturas más bajas (6,4 mS/cm) que los intervalos de 4 y 8 horas (6,9 mS/cm). Zeconi *et al.* (2004) concluyeron que para la detección de

mamitis es preferible el empleo de datos de CE del ordeño de la mañana al de la tarde, incluso con igual intervalo entre ordeños. Debido a que obtuvieron mejores resultados de sensibilidad en la mañana que en la tarde (59,76% frente al 55,49%) y una especificidad similar (48,49% frente al 49,61% respectivamente).

4.2.3. Fracción de leche ordeñada.

De forma general, la CE medida al final del ordeño es inferior a la registrada al inicio del ordeño; Lien y Wan (2000) encontraron mayor CE en los primeros chorros que en leche apurado en animales sanos. Peris *et al.* (1991) encontraron en ovino diferencias significativas en la CE entre las distintas fracciones, siendo menor en la leche de apurado que respecto en los primeros chorros o en leche máquina (3,83; 4,33 y 4,06 mS/cm, respectivamente), afirmando que la variación de la CE con la fracción de ordeño analizada se debía a que la leche apurado tenía mayor contenido en grasa que la leche máquina o los primeros chorros. En la misma línea, pero en cabras, Romero *et al.* (2012a), registraron una mayor CE en los primeros 100 mL (5,43 mS/cm) que disminuyó significativamente conforme avanzaba el ordeño, siendo de 5,28 mS/cm en la leche máquina y de 5,07 mS/cm en la leche de apurado, observando diferencias significativas entre la CE de glándulas sanas e infectadas solo en la leche de apurado (5,01, y 5,14 mS/cm respectivamente).

Bruckmaier *et al.* (2004a) observaron en glándulas infectadas una mayor CE en la leche cisternal (6,62 mS/cm) respecto a la primera mitad de la leche alveolar (entre 5,80 y 6,02 mS/cm) y la residual (6,15 mS/cm), no obtuvieron diferencias significativas entre fracciones en la leche de glándulas sanas, aunque la tendencia fue similar. Bruckmaier *et al.* (2004b) y Lien *et al.* (2005) observaron que la CE en cuartos infectados era mayor al inicio del ordeño (primeros 80 y 70 segundos, respectivamente) para descender de forma rápida e igualarse con la conductividad de cuartos sanos. Este aspecto afectó al método de detección de mamitis on-line, por lo que se optó por utilizar en el algoritmo de cálculo los valores máximos de CE, ya que ofrecían mejores resultados. Holdaway *et al.* (1996) no observaron efecto significativo de la fracción analizada sobre la CE, aunque la evolución fue distinta según si la leche procedía de glándulas infectadas o sanas, debido al efecto significativo que provocaba la interacción entre el estado sanitario y la fracción. De este

modo, la CE descendió a lo largo del ordeño en glándulas sanas, mientras que en las infectadas la CE era mayor en la leche máquina y apurado que en los primeros chorros.

4.2.4. Manejo de las muestras.

La conservación de la leche, tanto de oveja como de cabra, durante 48 horas tras su extracción a 4-5°C produce un aumento de la viscosidad, Ca soluble, Mg y P; y por tanto su CE (El-Deeb y Hassan, 1989), pudiendo afectar a los resultados obtenidos si se varían las condiciones de conservación.

4.3. MODELOS ESTADÍSTICOS O ALGORITMOS DE CÁLCULO EMPLEADOS PARA LA FORMACIÓN DEL UMBRAL DE ALARMA PARA LA DETECCIÓN DE MAMITIS MEDIANTE EL EMPLEO DE LA MEDIDA DE LA CE.

La correcta detección de mamitis por parte del ganadero *in situ*, es el principal objetivo en el desarrollo de los sistemas de medición automática de CE. Para ello, debe haber sido desarrollado previamente un modelo estadístico o algoritmo de cálculo que sea capaz de detectar si se ha producido con certeza algún caso de mamitis, además de su posterior validación.

Muchos sensores “*on-line*” son capaces de recopilar una gran cantidad de datos pudiéndose obtener muchas medidas por ordeño, incluso por glándula o durante muchos ordeños. Estos datos por sí solos no dicen nada, y deben ser procesados para generar información. Antes de comenzar a construir un modelo es importante conocer las características de los algoritmos y elegir uno adecuado para el modelo propuesto en particular, esto es esencial para optimizar y convertir los datos del sensor en valores que se puedan interpretar y que puedan marcar una gran diferencia en el rendimiento del sistema de sensores. La forma más simple de procesar los datos es tomar el valor de salida del sensor y compararlo con un valor umbral. Sin embargo, la mayoría de sensores *on-line* miden de forma continua y los datos deben ser tratados previamente para generar un valor final que pueda ser comparado.

Una limitación en el empleo de esta técnica en ovejas, es el hecho de que estos animales tienen solamente dos glándulas mamarias, por lo que durante la construcción del

algoritmo, cada glándula puede ser comparada solamente con su colateral, reduciendo el poder del algoritmo y la significación de los resultados. En cambio, en vacas, al tener cuatro glándulas, cada una de ellas puede ser comparada con las otras tres.

Es deseable, que el modelo de detección tenga una alta sensibilidad, especialmente para los casos más graves de mamitis clínica. Asimismo, el modelo debería tener un bajo número de falsos positivos y falsos negativos. Un sistema con una gran cantidad de falsas alarmas (falsos positivos) provocará un coste innecesario de tratamientos, mientras que si se producen falsos negativos no se detectarán los animales enfermos, produciéndose pérdidas económicas en la explotación, que estarán asociadas a una baja producción y un empeoramiento de la calidad y seguridad de la leche. Mollenhorst *et al.* (2012) realizaron una encuesta a 139 ganaderos con sistemas de ordeño automático en sus explotaciones, concluyendo que prefieren un sistema que produzca un número muy bajo de falsos positivos, y a su vez sea capaz de detectar rápidamente los casos de mamitis más severa.

4.3.1. Umbrales absolutos de CE.

Consiste en la definición de unos valores umbral de CE por encima del cual se sospecha que una o ambas glándulas de la ubre se encuentran infectadas. De ésta manera, se crea una alerta cuando el valor medido es mayor al umbral de referencia.

Lien *et al.* (2005) estudiaron el comportamiento de dos algoritmos de cálculo basados en la lectura de CE de cuarterones en vacas. El primero consistió en establecer un valor umbral absoluto ($CE > 5,54$ mS/cm) a partir del cual se daba como infectado al animal ($RCS > 500 \times 10^3$ cel/mL), se obtuvo una baja Se (33,3%) y una más aceptable Sp (79,6%) a pesar de haber adaptado el umbral a las características del rebaño. El segundo algoritmo se basó en establecer un umbral que comparaba la lectura del cuarto con mayor CE y el de menor lectura en la ubre para un ordeño dado ($CE_{max}/CE_{min} = 1,12$). En este caso, obtuvieron mejores resultados que con el primero (47,2% de Se y 81,7% de Sp).

Caria *et al.*, (2016), en ganado ovino con un umbral de 4,835 mS/cm lograron clasificar correctamente el 64,7 % de muestras cuyo $RCS > 700 \times 10^3$ cel/mL en ovejas Sardas. Peris *et al.* (1989), en ovejas Manchegas, propusieron dos umbrales para la detección de mamitis. El primero, consistía en que una glándula era diagnosticada como mamítica si superaba el umbral absoluto de 5 mS/cm, (Se=60,2% y Sp=91,4% con un 87,9% de muestras clasificadas correctamente). El otro umbral consistía en que la

diferencia de CE entre las dos glándulas del mismo animal fuese superior a 0,3 mS/cm, encontrando mejores resultados que con el anterior (70% de sensibilidad, 93% de especificidad y 89,1% de muestras clasificadas correctamente).

En ganado caprino, Díaz *et al.* (2011) propusieron una serie de umbrales absolutos de CE para la detección de mamitis (5; 5,10; 5,20; 5,30; 5,40; 5,50; 5,60; 5,70; 5,80; 5,90 y 6,00 mS/cm), registrando distintas Se y Sp en función de la granja, pero en todas se registró un incremento de la Sp y una disminución de la Se a medida que se incrementaba valor umbral de CE. En un estudio posterior realizado también en caprino, Romero *et al.* (2012a), estudiaron el uso de la CE para la detección de mamitis en función de la fracción de ordeño, concluyendo que los mejores resultados se dieron con un umbral de 5,20 mS/cm (Se=70% y Sp=50%) independientemente de la fracción de ordeño.

4.3.2. “Moving average” (media móvil).

Es el método más empleado y se basa en la comparación para una misma glándula del valor actual de CE con la media de los ordeños realizados con anterioridad, se debe fijar un umbral de incremento de CE (CE actual–media móvil de CE) a partir del cual se produce una alarma. El número de ordeños tenido en cuenta en el modelo y el umbral a partir del cual la alarma se produce es variable según la bibliografía consultada, así como los resultados de sensibilidad y especificidad conseguidos. Mele *et al.* (2001) en vacas, emplearon datos de los 14 últimos ordeños, y obtuvieron un 89% de sensibilidad y 88% de especificidad en la detección de mamitis clínica y subclínica. Lansberger *et al.* (1994) diseñaron un modelo en el que tenían en cuenta todos los ordeños desde el parto ponderados, pero el 25% de sensibilidad y el 9% de especificidad obtenido no fue satisfactorio, tal vez debido a que la comparación se realizaba con la media móvil del cuarto con menor CE en lugar de compararlo con el mismo cuarto analizado.

Secchiari *et al.* (1999) también en vacas propusieron distintos umbrales de alarma en función del estado de lactación. El 65% de sensibilidad obtenido no fue completamente satisfactorio, sin embargo, el 99% de especificidad fue superior al conseguido por Mele *et al.* (2001).

Cavero *et al.* (2006) estudiaron el comportamiento de varios algoritmos de cálculo, en el que dos de ellos estaban basados en el incremento de la CE de cada cuarto respecto a la media móvil de ordeños anteriores. En el primero de ellos se trataba de la media móvil

de los últimos 10 ordeños; el segundo la media móvil de todos los ordeños realizados durante la lactación, pero dando mayor importancia a los valores más cercanos en el tiempo. Los resultados de sensibilidad y especificidad obtenidos con ambos algoritmos fueron similares y variaron según el umbral de incremento de CE fijado (3-15%) y la definición de mamitis ($RCS > 100 \times 10^3$ ó $> 400 \times 10^3$ cel/mL). En el caso de $RCS > 100 \times 10^3$ cel/mL, el mejor resultado se consiguió empleando un umbral del 7% de incremento (84,7% de Se y 73,0% de Sp), mientras que para $RCS > 400 \times 10^3$ cel/mL, el mejor resultado se consiguió empleando un umbral del 9% de incremento (86,1% de Se y 81,6% de Sp). Concluyeron que el algoritmo de la media móvil que utilizaba los 10 últimos ordeños resultaba más sencillo de aplicar y presentaba los mismos resultados que los otros algoritmos estudiados.

Kamphuis *et al.* (2008) obtuvieron una sensibilidad del 80% para la detección de mamitis clínica en vacuno formulando incrementos del 16% sobre la media móvil de 5 ordeños conjuntamente, o incrementos del 50% sobre el valor previo, aunque el valor predictivo positivo (VPP) fue únicamente del 6,9-11%, lo cual implica una alta proporción de falsos positivos.

Romero *et al.* (2014), en ganado caprino establecieron incrementos del 5, 10, 20 o 30% sobre la media móvil de los últimos 4, 8 o 14 ordeños. La sensibilidad obtenida al aplicar los algoritmos a la medida de la CE fue muy baja, mejorando cuando se aplicaron las distintas reglas a la relación de la CE entre glándulas colaterales. Los autores concluyeron que el funcionamiento de los distintos algoritmos depende del tipo de mamitis presente en la explotación y los daños causados en la glándula

4.3.3. “Tracking Signal Method” (Método de señal de búsqueda).

De Mol *et al.* (1999) utilizaron en vacas este método consistente en el análisis de series temporales combinado con el empleo de “filtros Kalman”. Este método predice un valor teórico normal a partir de datos de CE de ordeños anteriores teniendo en cuenta otras variables: producción, temperatura, actividad física y cantidad de alimento concentrado consumido. Una desviación significativa del valor de CE detectado con respecto al valor marcado, es el determinante que hace que salte la alarma. La especificidad conseguida con intervalos de confianza del 95%, 99% y 99,9% fue muy elevada, (95%, 98%, 99%,

respectivamente), así como la sensibilidad, tanto para mamitis clínica (96%, 90%, 65%, respectivamente) como para la subclínica (100%, 76%, 57%, respectivamente).

Empleando el mismo método en un sistema de ordeño automático y, aunque las variables que tuvieron en cuenta solamente fueron la producción y temperatura de la leche e intervalo entre ordeños, De Mol y Ouweltjes (2002) consiguieron muy buenos resultados para mamitis clínica (100% de Se y 99% de Sp). Estos resultados son similares a los encontrados por Mele *et al.* (2001), quienes al comparar este método con el de la media móvil no encontraron diferencias entre ambos métodos tanto para mamitis clínica como para subclínica. Incluso fueron ligeramente superiores en el caso de la Sp con el método de señal de búsqueda (88% de Se y 97% de Sp).

4.3.4. **“Neural network” (Red neuronal).**

La técnica de las redes neuronales (RN) fue desarrollada en el campo de la inteligencia artificial para emular las redes neuronales biológicas del cerebro humano como un sistema de proceso de información. Las neuronas o nodos, se organizan en forma de capas. En estas redes, hay una capa de entrada de nodos que se proyecta sobre la siguiente capa de neuronas. La capa de salida genera una respuesta a una entrada dada. Entre la entrada externa y la red de salida, existen una o más capas intermedias llamadas capas ocultas. La estructura de las capas ocultas puede variar en términos tanto en el número de capas ocultas como en el número de neuronas de la misma.

Cada nodo de las capas ocultas y de salida suma las señales ponderadas de los nodos anteriores y una tendencia; a continuación, la transmisión de la señal resultante para los siguientes nodos proporciona una función no lineal llamada función de activación.

Para su buen funcionamiento la red debe ser entrenada, y con este fin, pares de entradas y salidas que ofrezcan información sobre el entorno de interés son dados a la RN en el set de entrenamiento. El valor de salida calculado se compara con el requerido, entonces el algoritmo probado interactúa ajustando la influencia de la conexión entre dos nodos o peso sináptico y los sesgos de la red neuronal para minimizar la función de error dada entre la respuesta deseada y la respuesta real de la red.

Cavero *et al.* (2008) utilizaron alertas de mamitis que fueron generadas mediante un modelo de RN empleando la CE, la producción, la velocidad de emisión y días de ordeño como datos de entrada. Para una Se del 80%, la Sp varió entre el 51,1% y el 74,9%,

dependiendo de la definición de mamitis, con un porcentaje de error para la clasificación de las muestras entre el 51,3% y el 80,5%. Concluyeron que en su estudio el rendimiento de las RN no fue satisfactorio, probablemente debido a la insuficiente información de entrada relacionada con la mamitis.

Nielen *et al.* (1995a; 1995b) aplicaron un complejo método estadístico con redes neuronales en la detección de mamitis clínica y subclínica. Se producía una alerta si se superaba el umbral fijado al menos 6 veces en los últimos 14 días, compararon los resultados obtenidos en función de si esos 14 días comprendían hasta el ordeño anterior al cuestionado, el actual o el siguiente. Obtuvieron un 77% de sensibilidad, mejor que si el periodo de referencia incluía el día siguiente, aunque llevaba asociado un pobre resultado de especificidad del 69%. Además, presentaba la limitación de que al intentar aumentar la especificidad se reducía la sensibilidad. En mamitis subclínica los resultados fueron similares (54% de Se y 92% de Sp).

Ankinakatte *et al.*, (2013) ensayaron un modelo en el que emplearon la CE de la leche, el RCS, la actividad de la lactato-deshidrogenasa y la producción, diseñado de tal forma que aunque alguna de las variables fallaba, el método podía seguir siendo utilizado. Fijaron una Sp del 80%, con lo que obtuvieron una Se del 75%,

4.3.5. “Bayesian network” (Red Bayesiana).

Las redes Bayesianas permiten diferentes estructuras gráficas de distinta complejidad. Las *Naive Bayesian networks* (redes Bayesianas simples (NBN)) son el tipo más simple de redes Bayesianas. En investigación veterinaria, fue descrita, por ejemplo, por Steeneveld *et al.* (2009). Una NBN consiste en una simple variable de salida que representa las posibles clases de la variable dependiente de un estudio y de un conjunto de variables características que modelan los niveles de las variables independientes del estudio.

Las NBN están construidas normalmente a partir de datos que consisten en la determinación de las probabilidades a priori para la variable de salida y de la estimación de las probabilidades condicionales para las variables características dadas las posibles clases de la variable dependiente. En esencia, todas las variables características disponibles pueden ser incluidas en una NBN. Existen métodos, sin embargo, para la selección de solamente aquellas variables características que mejor discriminan entre las diferentes

clases de una variable dependiente, anticipándose de este modo a un sobreajuste de datos (Langley y Sage, 1994).

En el estudio realizado por Steeneveld *et al.* (2010), se empleó la *wrapper-based backward elimination* (eliminación hacia atrás basada en el reinicio) para seleccionar variables características apropiadas de todas las variables definidas. Emplearon una NBN con el fin de discriminar entre VP y FP, las alertas fueron determinadas basándose en la CE, el color o ambas. Un total de 11156 ordeños tuvieron alertas para mamitis clínicas, de las cuales 159 fueron VP y 10997 FP. En el caso de las mamitis clínicas, obtuvieron un 70% de Se y un 97,8% de Sp, pero con un escaso valor predictivo positivo (1,4%), por lo que se estaría generando un gran porcentaje de falsas alarmas.

Fosgate *et al.* (2013), utilizando también un modelo basado en una red Bayesiana para el cálculo de la especificidad y la sensibilidad del método, obtuvieron una Se=89,9% y Sp=86,8% con un punto de corte de la CE (medida a través de la resistencia) $>25\text{m}\Omega/\text{cm}$.

4.3.6. Otros métodos.

Varios autores han estudiado el comportamiento de algoritmos de cálculo, en los que, generalmente, se han comparado las lecturas de CE entre las distintas glándulas del mismo animal.

Maatje *et al.* (1992 1997) desarrollaron un método en el que se comparaba la lectura de CE individual con la media de los 6 últimos días en el cuarterón con menor valor. Comprobaron diferentes umbrales y realizaron modificaciones del modelo original, logrando resultados excelentes para mamitis clínica cuando se empleaba como umbral un incremento del 20% (la Se fue del 100% y 95%, para los dos experimentos realizados, respectivamente). En el caso de mamitis subclínica, la alarma saltaba si ese umbral se superaba en dos ocasiones durante los últimos 6 ordeños, concluyendo que el empleo del umbral del 20% no era satisfactorio (solo obtuvieron un 50% de Se) mientras que el sistema sí que resultaba útil si se empleaba el umbral de 10% (100% de Se).

Hovinen *et al.* (2006) comprobaron el funcionamiento de dos sistemas instalados en “robots de ordeño” de granjas comerciales de vacuno para la detección de mamitis (definida como glándulas con RCS $>200 \times 10^3$, $>400 \times 10^3$ ó $>1000 \times 10^3$ cel/mL). Uno de ellos estaba basado en la medición de la CE en la ubre y el análisis del incremento en cada cuarto con respecto a la media de los cuatro cuartos del animal. El otro sistema ensayado

también se basaba en la comparación de la CE entre cuartos, pero calculaba el incremento entre el cuarto con CE máxima y el de CE mínima del mismo animal. En ambos sistemas los resultados de especificidad fueron satisfactorios (entre el 87,3 y 100%, siendo mejores en el segundo sistema), no sucedió lo mismo con los valores de sensibilidad que variaron entre el 8,8 y 42,9% en el primer sistema y entre 4,9 y 30,4% en el segundo. Comparando ambos sistemas, los mejores resultados se obtuvieron en el primero y, dentro de este, cuando se utilizaban dos umbrales de alarma, uno con un incremento del 15%, no teniendo en cuenta datos $<3,8$ mS/cm, y el otro igual al anterior pero descartando datos $<3,3$ mS/cm (con el mismo resultado), mientras que los peores se obtuvieron en el segundo sistema donde se utilizó un umbral de alarma en el que se debía producir un incremento de al menos el 20% durante dos ordeño seguidos juntamente con que la media de dicho incremento de los tres últimos ordeños también fuese del 20%.

Zaninelli *et al.* (2015) evaluaron el uso del análisis del espectro de Fourier de la lectura on-line de la CE de la leche glandular como método de detección de mamitis, concluyendo que en las glándulas mamíticas la CE presenta fluctuaciones más lentas y una tendencia irregular, por lo que los picos de frecuencia obtenidos mediante la transformada de Fourier podrían ser usados como indicadores de mamitis y ser incluidos en el diseño de algoritmos para la detección de mamitis mediante la lectura de CE on-line. Posteriormente, Zaninelli *et al.* 2016 incluyeron estos picos de frecuencia en un modelo basado en la lógica difusa (“fuzzy logic”) llegando a obtener una $Sp=78\%$ y una $Se=80\%$.

4.4. DISPOSITIVOS PARA LA MEDIDA DE LA CE ON-LINE.

La CE es el indicador empleado más común y ampliamente estudiado para detectar mamitis clínica y subclínica en los actuales modelos utilizados en sistemas de ordeño automático. Comparado con otros parámetros de la leche, la CE presenta la ventaja de que puede ser medida de forma automática mediante electrodos incorporados a la unidad de ordeño. La medición de éste parámetro puede convertirse en una señal legible por el ordenador y, por lo tanto, fácilmente aplicable para el control automático en línea del estado sanitario de la glándula mamaria, pudiendo ser instalado en la unidad de ordeño (Pyörälä, 2003). Gracias a su simplicidad técnica y bajo coste es un método fácilmente aplicable *on-line*. Por ejemplo, Ferrero *et al.* (2014) estudiaron un prototipo con el que se obtuvo una alta sensibilidad y su coste rondaba solo los 20 dólares.

Los sistemas automáticos que registran la CE de cada glándula se encuentran ampliamente diseminados en muchas granjas de vacas en Europa y en los Estados Unidos, mientras que similares sistemas para ovejas y cabras lecheras son de introducción tardía y aunque todavía no se han extendido a nivel de granja (Tangorra *et al.*, 2010) hay algunos autores que ya han trabajado con prototipos y algoritmos para la detección mediante la medida de la CE en ganado caprino (Romero *et al.*, 2012; Zaninelli *et al.*, 2015).

4.4.1. Conductímetros empleados en laboratorio.

Existe una amplia variedad de modelos de conductímetros que pueden ser utilizados en diferentes disoluciones, ya que algunos pueden llegar a tener hasta cuatro rangos de medida. Debido a ello, en la elección del aparato se deberá tener en cuenta la naturaleza de la disolución que va a ser analizada, sus características (corrosiva, alimentaria, etc.) y los rangos de CE en los que se va a trabajar (baja, media, elevada).

La mayoría de conductímetros quedan englobados en dos rangos de medición, de 0 a 1999 $\mu\text{S}/\text{cm}$ y de 0 a 199,9 $\mu\text{S}/\text{cm}$. Además existen otros dos rangos de medición más amplios de 0 a 6000 $\mu\text{S}/\text{cm}$ y de 30 a 50000 $\mu\text{S}/\text{cm}$. Éstos últimos son empleados en soluciones con altas concentraciones de sólidos disueltos. Pero a la hora de elegir el conductímetro apropiado, no solo hay que basarse en el rango de medición, sino que hay que basarse también en la resolución y la precisión del equipo, así como la posibilidad de calibración. La resolución de un conductímetro es la mínima unidad de CE que es capaz de diferenciar y por tanto de leer, de manera que será considerada una alta resolución cuanto menor sea esa unidad de diferenciación. Depende del rango de medición del conductímetro, de manera que a rangos más amplios, la resolución del aparato será menor.

Una de las características que pueden presentar los conductímetros es la compensación o corrección de la lectura según la temperatura. Esto se debe a que la CE se incrementa con la temperatura, y al mismo tiempo se ve afectada por el tipo, número de iones y por la viscosidad de la solución. Esta propiedad permite estimar la lectura de CE en la solución analizada como si estuviera a una temperatura dada. El aumento de la temperatura en 1°C incrementa la CE de la solución por término medio un 2-3% (Maron y Prutton, 1972). La dependencia de la CE de la temperatura es expresada como un cambio relativo por grados Celsius a una temperatura puntual. Para soluciones iónicas comunes, este valor se encuentra alrededor del $2\%/^{\circ}\text{C}$, mientras que para soluciones ácidas, alcalinas

y concentradas de sal presentan valores más bajos, 1,5%/°C. Esta propiedad de los conductímetros evita el inconveniente de que una pequeña diferencia en la temperatura provoque un gran cambio en la CE, pudiendo confundirse el efecto de la temperatura con el de otro factor que se quiera analizar.

La compensación de la temperatura puede ser manual o automática, y algunos conductímetros ofrecen ambas posibilidades. En ambos tipos, la temperatura de la solución puede oscilar de 0 a 50°C y el coeficiente de temperatura varía entre el 2 y el 2,5%/°C. Las lecturas de las mediciones suelen estar normalizadas a 25 ó 20°C, siendo esta última menos empleada. Para que la compensación de temperatura pueda ser realizada debe llevar incorporado un sensor de temperatura (ATC) que determine la temperatura real y así, sea posible recalcular la CE según la temperatura y el factor de compensación.

- **Tipos de sondas de conductividad eléctrica.**

La lectura o detección de la CE de una solución se realiza mediante sondas, que pueden ser conductivas o inductivas.

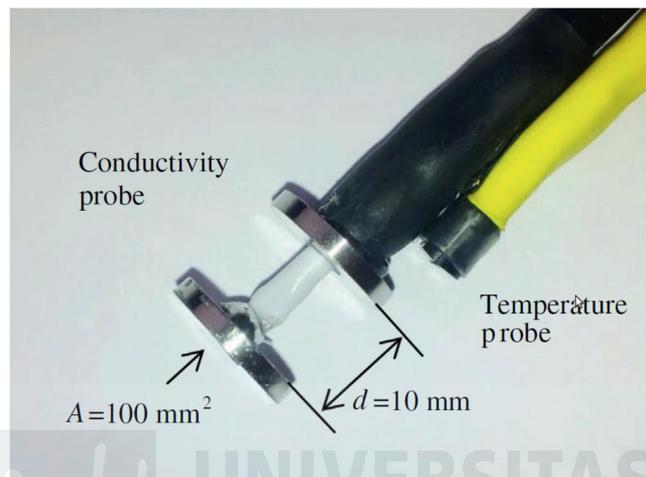
Los electrodos de las sondas conductivas están fabricados en platino o en acero inoxidable y pueden llevar un sensor interno de temperatura, cuyo rango de medición varía de -50 a +250°C. Además, suelen ofrecer un diseño con forma de puntas afiladas que permite obtener rápidos tiempos de respuesta en condiciones de altas temperaturas (hasta 250°C).

Por otro lado, las sondas inductivas están basadas en el principio de inducción, en el que los anillos primarios aplican una corriente alterna e inducen un campo eléctrico en la solución que provoca una caída de tensión medida en los anillos secundarios. Esta caída de tensión es proporcional a la conductividad de la solución. Este sistema posee ventajas sobre el sistema anterior, ya que proporciona lecturas lineales a lo largo de un amplio rango, no presenta polarización ni descomposición del electrodo, y no necesita limpiezas exhaustivas. Además no requiere recalibraciones ni cambios de sonda frecuentes. Estas sondas suelen ir recubiertas de materiales que evitan su contacto directo con la disolución a analizar y protegen a los anillos del deterioro (materiales corrosivos: ácidos, básicos, etc.).

Los electrodos de las sondas conductivas están montados en cuerpos de cristal o PVC para evitar su deformación durante la manipulación, y presentan problemas debido al deterioro de los electrodos (polarización y descomposición). En la Figura 1.12 se puede ver

un ejemplo de sonda conductiva construida en el laboratorio por Ferrero *et al.* (2014). Está compuesta de dos electrodos de acero inoxidable con un área efectiva de 100 mm^2 y 10 mm de separación. Por el centro de los anillos pasa un cable coaxial cuya malla se suelda a uno de los anillos, y el cable interior al otro anillo.

Figura I.1. Sonda de conductividad y temperatura (Ferrero *et al.*, 2014).



4.4.2. Conductímetros empleados en la industria.

En la industria son más prácticos los conductímetros inductivos específicos para medir la conductividad en soluciones con partículas suspendidas (bebidas, alimentos, etc.) debido a que se evitan los problemas por la descomposición del electrodo a causa de la naturaleza de la disolución a analizar y las disoluciones de lavado. Además, presentan la ventaja de poder recubrirse de materiales sanitarios que los hacen aptos para uso alimentario

Los conductímetros que se pueden utilizar en el campo industrial tienen rangos de medición muy dispares, según la aplicación que se vaya a realizar (aguas, lodos, alimentos, etc.). La precisión de los conductímetros se encuentra entre el 1-2% del factor de escala (a 20°C) y la desviación típica oscila entre el 1-2% del factor de escala. La calibración, al igual que en los conductímetros de laboratorio, puede ser manual o automática, y no prevalece ninguno de los dos.

- **Equipos empleados para la medición manual de la CE.**

Son escasos los datos publicados sobre equipos utilizados en las granjas para la medición de la CE a nivel comercial, a pesar de ser una variable relativamente estudiada para la detección de mamitis en ganado vacuno y empleada en robots de ordeño.

Estos dispositivos se emplean para detectar mamitis subclínica en su fase inicial e indetectable visualmente. En general se basan en el análisis de los primeros chorros de la leche de las glándulas, recogidos en un pocillo dispuesto en el equipo en el que se encuentran los electrodos. A continuación se citan algunos de ellos:

- El lector *Draminski* (Figura I.2. A), se basa en la lectura de la resistencia eléctrica (inversa de la conductividad). Seguya y Mansell (2000), comprobaron su funcionamiento en vacuno con elevadas prevalencias de mamitis. La medida de la resistencia de glándulas sanas o infectadas en algunos casos era similar, por lo que no se pudo distinguir con una fiabilidad completa entre ellas.

- El *Mas-D-Tec* (Wescor, Logan UTA, USA) se basa en la conductividad de la muestra y la observación de dos criterios: CE mayor de 5 y la diferencia entre el valor máximo y el mínimo de glándulas del mismo animal (Figura I.2. B). Musser *et al.* (1998) probaron el funcionamiento del equipo de acuerdo a los umbrales propuestos por el fabricante, encontrando un 71% de FP y un 11% de FN.

- En un estudio llevado a cabo por Janzekovic *et al.* (2009) para detectar mamitis subclínica en el que emplearon el dispositivo *Mastitron LF 3000* (Figura I.2.C) combinado con lecturas de células somáticas, se encontró que la fiabilidad de la medida de la CE para el valor más alto de 6,5 mS/cm fue del 80%. Además, al evaluar las diferencias entre cuartos con diferencias superiores a 1 mS/cm también se confirmó la mamitis subclínica con un 73,7% de fiabilidad.

- En un estudio llevado a cabo por Suarez *et al.* (2014) con cabras de la raza Saanen (71,9%), y en menor proporción Toggenburg (17,4%) y Alpina (10,7%), para detectar mamitis subclínica, con el *Milk Checker N-4L* (Figura I.2.D) obtuvieron una sensibilidad y especificidad del 58% y 60% respectivamente.

- En el estudio llevado a cabo por Fosgate *et al.* (2013) en ganado vacuno, cuyos resultados se mencionan anteriormente (Apartado 4.3.5.) utilizaron el *Mast-O-Tec* (Figura I.2. E).

Figura I.2. Equipos manuales para la detección de mamitis mediante CE en leche en granja.

A) Draminski (Polonia)



B) Mas-D-Tec (USA)



C) Mastitron LF 3000



D) Milk Checker N-4L (Japón)



E) Mast-O-Test, Durotec.



- **Equipos empleados para la medición automática de la CE durante el ordeño.**

Los distintos métodos para la medida de la CE *on-line* difieren si la medición se realiza para la leche en su totalidad o si proviene de cada glándula. En el primer caso, la sonda del sensor está localizada en el tubo largo de leche, que está antes de llegar al medidor electrónico, y en el segundo caso está localizada en el tubo corto de leche. En ambos casos los datos de conductividad se registran durante el ordeño, cuando la leche circula a través de los tubos. Éstos, son procesados en un ordenador central que utiliza un modelo o algoritmo para detectar si la ubre o glándula son candidatas a estar afectadas por la mamitis.

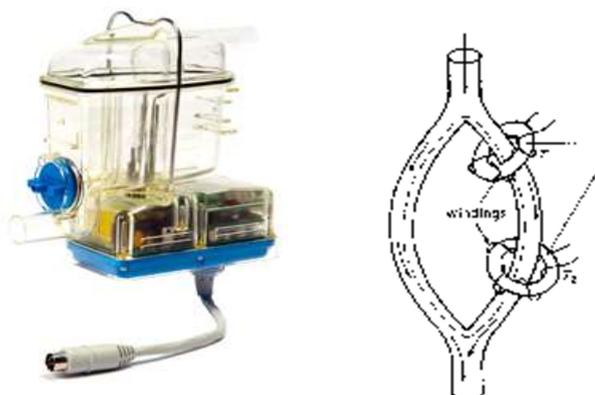
Con respecto a los equipos automáticos *on-line*, existe poca información sobre los diseños debido a que en su mayoría están protegidos por patente. En la Figura I.3 (A) podemos ver el medidor *Afimilk* (Afikim, Israel), que mide CE y producción por ubre a

intervalos de 200 mL, siendo el primer medidor electrónico de producción homologado por el ICAR tanto para vacuno como para pequeños rumiantes y que ha sido empleado en diversos estudios. Otros equipos, como en el caso del robot de ordeño “Leonardo” (*Wesfalia Surge GmbH*) su sistema calcula la media generada a partir de valores máximos grabados cada 200 mL.

Como se puede ver en la Figura I.3 (B) Onyango *et al.* (1988) desarrollaron un conductímetro que empleaba sondas toroidales, capaces de medir la conductividad sin necesidad de entrar en contacto con la leche, por lo que evitaba los problemas derivados de la degradación de los electrodos u obstrucciones en el flujo de leche. Los toroides consistían en un hilo conductor enrollado sobre un cuerpo en forma de anillo y recubiertos por resina epoxi. Estos anillos se montaron alrededor del tubo por donde circulaba la leche procedente de la glándula. A un toroide se le aplicaba una tensión que inducía una corriente electromagnética en la leche cuya amplitud dependía de la conductancia de la misma. Esta corriente inducía a su vez una corriente electromagnética en el conductor del otro toroide, la cual se medía y se utilizaba para obtener la conductividad.

Figura I.3. Equipos utilizados para la lectura de CE “on-line” en la sala de ordeño (Romero, 2009).

A) *Afimilk* (Afikim, Israel) B) Onyango *et al.* (1988)



En la Figura I.4, vemos el sistema Afimilk MPC, que es a su vez un medidor de producción aprobado por el ICAR y un sistema de detección de mamitis mediante la medida de la CE de la leche.

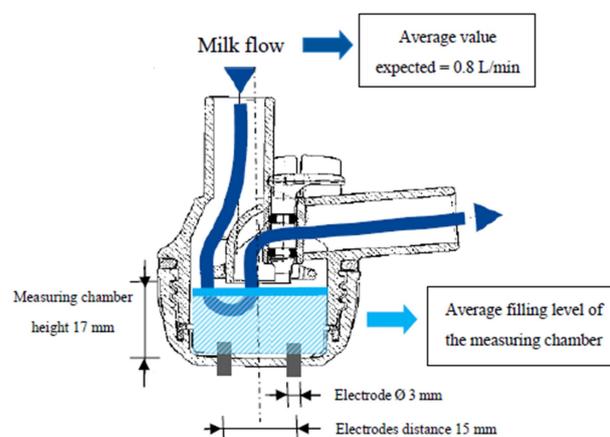
Figura I.4. Sistema Afimilk MPC. (www.afimilk.com)



Otro equipo para la detección de mamitis on-line mediante la medida de la CE de la leche es el MM27BC, de DeLaval. Este equipo también es capaz de detectar restos de sangre en leche. El MM27BC está diseñado para ganado vacuno. Para ganado caprino u ovino, la misma casa comercial dispone de un modelo similar, el MM25BC, pero no detecta la enfermedad on-line.

Tangorra *et al.* (2010) y Zaninelli *et al.* (2016) utilizaron un juego de ordeño con las pezoneras comerciales previamente modificadas, insertando en el fondo de cada una de ellas un par de electrodos de acero que permitían la medida de la CE on-line por glándula (Figura I.5).

Figura I.5. Pezonera modificada utilizada para la medida de la CE on-line por cuarterón (Zaninelli *et al.*, 2016).



4.4.3. Sensibilidad y especificidad de la CE en la detección de mamitis.

Existen una serie de opciones para la identificación de la mamitis pero todas tienen diferencias respecto a la precisión (Se y Sp) y a los costes. El RCS así como la CE y su inversa (la resistencia) son los métodos más comunes para la identificación de la inflamación de la glándula. La dificultad en la estimación del diagnóstico de la sensibilidad y la especificidad es la falta de un estándar de oro o umbral para clasificar ganado que tenga mamitis (Dohoo *et al.*, 2011). Por otro lado, la Sp y la Se varían dependiendo del algoritmo empleado, el tipo de mamitis detectada (subclínica o clínica), y el uso de distintas combinaciones de variables (de Mol *et al.*, 1999; Zecconi *et al.*, 2004; Cavero *et al.*, 2006, 2007).

Cuando se hacen recomendaciones sobre una prueba de diagnóstico, es importante considerar las consecuencias de los falsos positivos y falsos negativos, ya que éstos están directamente relacionados con la sensibilidad y la especificidad. En el caso de la mamitis, los costes de tratamiento o sacrificio de los animales infectados son factores importantes. En general, si el objetivo es reducir la prevalencia de la infección sin eliminarla necesariamente; la especificidad tiene prioridad. Sin embargo, si lo que se quiere es eliminar la enfermedad, la sensibilidad debería tener mayor prioridad que la especificidad (Clements *et al.*, 2003; Lafi, 2006; Nunes *et al.*, 2008).

Hasta la fecha, la CE es el indicador más comúnmente utilizado en el control sanitario *on-line* de la ubre. Los electrodos empleados son económicos y pueden ser puestos en funcionamiento *on-line* fácilmente. Sin embargo, cuando la CE es usada para la detección de infecciones en la ubre existe una alta variación en la sensibilidad y la especificidad de las pruebas que van desde el 28 hasta el 90% y del 92 hasta el 97%, respectivamente (Wiedemann, 2004).

Sherlock *et al.* (2008) señalaron que la especificidad para la clasificación de cuartos sanos es un indicador confuso en el rendimiento de la detección y sugirió el empleo del porcentaje de éxito y el porcentaje de falsas alarmas. Esto fue demostrado en un estudio llevado a cabo por Hovinen *et al.* (2006) para una compañía que fabricaba sistemas automáticos de ordeño, donde la Sp para la CE fue bastante alta, pero el porcentaje de falsas alarmas también lo fue (32 falsas alarmas/1000 vacas ordeñadas).

Un motivo para una baja Se, Sp, o ambas, puede ser la fuerte influencia de, por ejemplo, la fracción de leche, la viscosidad, la temperatura, y las condiciones técnicas sobre el

resultado de las medidas resultantes, lo cual subraya la necesidad de un procedimiento claro y la calibración del sensor (Hogeveen y Ouweltjes, 2002; Bruckmaier *et al.*, 2004a). La variación de la CE durante el ordeño, por ejemplo, podría aportar información adicional sobre el estado sanitario de los cuartos comparado con las lecturas absolutas o relativas (Barth *et al.*, 2000).

Fosgate *et al.* (2013) estimaron con un modelo Bayesiano la sensibilidad y la especificidad de la CE en vacas (medida mediante la resistencia) llegando al 89,9 y 86,8% respectivamente, con un valor de corte >25 mS/cm. La evaluación de la CE y el CMT en los rebños muestreados por estos autores indican que la Se y la Sp de las pruebas realizadas podrían ser adecuadas para emplearlas en tests *in situ* con el animal. Por su parte Nielen *et al.* (1992), en un anterior meta-análisis estimaron la Se y la Sp de la CE en un 66% y 94%, respectivamente. Mansell y Seguya (2003) encontraron que la Se y la Sp de un conductímetro portátil para la detección de mamitis subclínica fue del 51 y 71% respectivamente. En otro estudio llevado a cabo por Steeneveld *et al.* (2010) usando un sistema para medir la conductividad “on-line”, estimaron la Se y la Sp de la CE en un 70 y 98%, respectivamente, para la detección de mamitis clínica. En el mismo estudio, el número de falsas alertas positivas se redujo un 35%, y el 10% de los verdaderos positivos no pudieron ser identificados.

Romero *et al.* (2012) obtuvieron una sensibilidad y una especificidad del 70% y 50% respectivamente, para un umbral de CE de 5,20 mS/cm en leche de cabra. Para umbrales altos de CE, la sensibilidad fue menor y el valor predictivo negativo disminuyó, debido al gran número de falsos negativos. Díaz *et al.* (2011) analizaron datos de tres granjas de cabras distintas e indicaron que para un umbral de 5,20 mS/cm las sensibilidades oscilaron entre el 60 y 93% y las especificidades entre 22 y 47% dependiendo de la granja considerada.

Siguiendo en el ganado caprino, Zaninelli *et al.* (2014) empleando *fuzzy logic*, encontraron una sensibilidad y una especificidad del 81 y 69% respectivamente. En un estudio posterior, Zaninelli *et al.* (2016), utilizando un modelo basado en la lógica difusa (“fuzzy logic”) llegaron a obtener una Sp=78% y una Se=80%.

Norberg *et al.* (2004a) supervisó diferentes medidas de CE en la leche de cuartos en vacas de forma individual demostrando una detección de mamitis clínica con una Sp que oscilaba entre el 91,9 y 98%, y una Se entre el 16,2 y el 47,9%.

En un estudio sobre ovejas llevado a cabo por Barth *et al.* (2007) la CE media fue baja, pero difería significativamente entre el grupo de glándulas con secreción normal y con mamitis: 4,9 y 5,5 mS/cm, respectivamente. A pesar de que la comparación de medias mejoró la especificidad de la prueba: 96,1% en la elección de 0,2 mS/cm como valor límite, la sensibilidad empeoró significativamente hasta el 35,3% y concluyeron que aunque la CE puede ser empleada para controlar el estado sanitario de la ubre en ovejas lecheras, debe llevarse a cabo sobre una base regular para lograr resultados fiables en el rendimiento. También en ovejas lecheras, Caria *et al.* (2016) lograron clasificar correctamente el 64,7 % de muestras cuyo RCS > 700 x 10³ cel/mL con un umbral de 4,835 mS/cm.

Kamphuis *et al.* (2010) fueron capaces de disminuir el número de alertas de FP en más del 50 % con un modelo de árbol de decisión a partir de datos recogidos por un sensor capaz de medir CE y color de la leche. Manteniendo el nivel de Sp (97,9%) de los modelos actualmente usados por estos sistemas. Para una Sp del 99%, fueron detectados el 40% de los casos de mamitis clínicas.

Biggadike *et al.* (2002) obtuvieron una sensibilidad del 40% para un RCS > 200 x 10³ cel/mL. y una especificidad del 85 %. Cuando se incrementó el criterio para el RCS hasta más de 400 x 10³ cel/mL., la sensibilidad y la especificidad se incrementaron hasta el 54 y 92%, respectivamente.

En otro estudio de campo llevado a cabo por Hovinen *et al.* (2006) con dos sistemas de ordeño distintos, la Se para detectar cuartos mamíticos fue del 5 y 18% para RCS > 200 x 10³ cel/mL. Y cuando las glándulas mamíticas se definieron como aquellas cuyo RCS > 1.000 x 10³ cel/mL, la Se fue del 9 y el 43% dependiendo del sistema de ordeño automático. La Sp fue del 98 y 100% para el primer criterio de RCS y entre el 97 y el 99% para el segundo, según el sistema de ordeño empleado.

Dhakal *et al.*, (2008) observaron que el mejor equilibrio entre Se y Sp para el diagnóstico de mamitis en búfala mediante la lectura de la CE se encontraba en un valor de corte de 3,7 mS/cm en el caso de mamitis subclínicas, pudiendo elevarse el umbral a 3,9 mS/cm para la detección de mamitis clínicas, concluyendo que un valor absoluto de CE > 4 y diferencial > 0,5 debería ser considerado indicativo de mamitis subclínica.

En general, la Se y la Sp cuando se emplean sensores deberían ser los principales factores en la evaluación, junto a las exigencias en calibración y mantenimiento, duración del ciclo operativo, costes, y solidez. La sensibilidad y la especificidad son importantes para asegurar la longevidad de las explotaciones agrícolas, proporcionar listas de alerta fiables, y para ser aplicables en los procesos de automatización (Hogeveen y Ouweltjes, 2002; Mottram *et al.*, 2002).



II. OBJETIVOS.



II. OBJETIVOS.

El objetivo general de esta Tesis Doctoral consiste en estudiar el uso de la conductividad eléctrica de la leche (CE) como método automático de detección de mamitis durante el ordeño mecánico de ovejas de raza Manchega.

Para ello se han propuesto 4 objetivos específicos:

1. Estudiar el efecto de distintos factores no infecciosos (estado de lactación, número de parto, sesión de ordeño y fracción de ordeño) e infecciosos (estado sanitario de las glándula mamaria) en la lectura de la CE de la leche (Ensayo 1).
2. Estudiar el empleo de umbrales absolutos de CE para discriminar el estado sanitario de las glándulas mamarias (Ensayo 1).
3. Estudiar el efecto de la instauración de la infección intramamaria en la CE de la leche glandular y su evolución en el tiempo siguiente a la infección (Ensayo 2).
4. Evaluar la capacidad de detección de mamitis de diversos algoritmos basados en la medida diaria de la CE de la leche glandular utilizando un conductímetro de laboratorio y un prototipo diseñado para la lectura automática diaria de la CE de la leche a nivel de glándula mamaria durante el ordeño mecánico (Ensayo 2).

III. MATERIALES Y MÉTODOS GENERALES.



III. MATERIALES Y MÉTODOS GENERALES.

En este capítulo se describe de forma general el lugar de realización de los dos ensayos que componen la presente Tesis Doctoral así como la metodología empleada en el análisis de las variables estudiadas.

El diseño experimental, procedimiento de toma de muestras, las variables analizadas y el tratamiento estadístico realizado se describen en cada uno de los Ensayos. Si en algún experimento fue necesario realizar alguna variación respecto a estos materiales Métodos Generales, se detallará en el capítulo correspondiente.

1. LUGAR DE REALIZACIÓN.

Los dos Ensayos se realizaron en las instalaciones de la Granja Docente y Experimental de Pequeños Rumiantes de la Escuela Politécnica Superior de Orihuela de la Universidad Miguel Hernández (UMH). La granja cuenta con cabras de raza Murciano-Granadinas y ovejas de raza Manchega.

Las instalaciones cuentan con dos patios de ejercicios a los que los animales tienen acceso libre durante el día. También dispone de una sala de lactancia artificial con condiciones ambientales controladas y suelo enrejillado de PVC elevado de la solera, la cual está diseñada en pendiente para facilitar la evacuación de residuos orgánicos y de dos salas separadas del aprisco de las hembras, en las que se alojan los machos y la reposición.

Dispone también de lechería (provista de dos tanques de refrigeración de 600 y de 850 L de capacidad), sala de máquinas y sala de espera-sala de ordeño, totalmente separadas. La sala de ordeño es de tipo “Casse” con 2 plataformas, 12 plazas por plataforma, un equipo de ordeño instalado en Línea Baja (LB) en una de las plataformas que cuenta con 12 juegos de ordeño (con pezoneras intercambiables, para cabras u ovejas) Top Flow (Gea Farm Technologies, Bönen – Alemania) (1x12x12) y otra en Línea Alta (LA) que cuenta con 12 juegos de ordeño similares a los de la línea baja y ofrece la posibilidad de ser utilizada en las 2 plataformas (2x12x12) (Figura III.1). Ambos equipos han sido montados por la casa Gea Farm Technologies. Las dos plataformas disponen de un amarre de salida rápida frontal. La sala cuenta con todos los automatismos necesarios para realizar una gestión integral de la explotación: medidores de flujo (Lactoflow, Gea Farm Technologies, Bönen – Alemania) comandados por un programa informático

(DairyPlan, Gea Farm Technologies, Bönen – Alemania) y sistemas de lectura automática de bolos ruminales/crotales electrónicos montados en unas mangas de manejo situadas a la entrada de los amarres.

Figura III.1. Panorámica de la sala de ordeño utilizada en los experimentos.



El ritmo reproductivo de las ovejas fue de 1 parto anual, agrupándose todas en un solo lote productivo. Tras el parto, los corderos se mantuvieron con las madres durante 5 semanas (Figura III.2.). Cuando se destetaron, las madres se ordeñaron mecánicamente 2 veces al día (8:00 h y 16:00 h). La rutina de ordeño empleada fue la de “puesta y retirada” con repaso a máquina y sellado de pezones tras el ordeño mediante inmersión en una solución yodada. Los parámetros de ordeño fueron 36 kPa de nivel de vacío, 180 pulsaciones por minuto y 50% de relación de pulsación. La dieta, consistente en 2,5 kg diarios de mezcla “unifeed” y paja “ad libitum” se mantuvo constante a lo largo de cada una de las lactaciones en las que se realizaron los experimentos.

Figura III. 2. Ovejas Manchegas con sus corderos antes del destete.



La granja docente de la UMH cumple las normas sobre protección de animales utilizados en experimentación animal y otros fines científicos descritas en el RD 53/2013. De igual forma, se realiza un seguimiento periódico, en colaboración con la Unidad de Análisis de Sanidad Animal de la Consejería de Agricultura de la Comunidad Valenciana del estado sanitario de las cabras (Tuberculosis, Brucelosis, AEC y Lengua Azul) y de las ovejas (Tuberculosis, Brucelosis y Lengua Azul). De forma voluntaria se hace un seguimiento de micoplasmas en leche de tanque. La Granja Docente cumple con los criterios de Ecocondicionalidad y Bienestar Animal establecidos por la Generalitat Valenciana para la obtención de fondos públicos de ayuda a la producción ganadera.

2. VARIABLES ANALIZADAS.

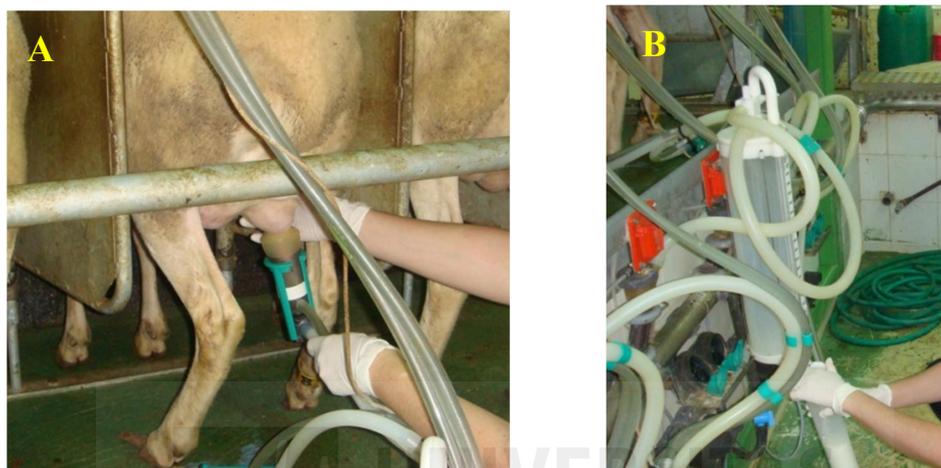
Todos los análisis de las muestras de leche recogidas a lo largo de los experimentos, así como el posterior tratamiento y análisis estadístico de los datos se realizaron en la Universidad Miguel Hernández, excepto el análisis del Recuento de Células Somáticas que se realizó en el LICOVAL (Laboratorio Interprofesional Lechero de la Comunidad Valenciana).

2.1. Producción.

La producción de leche de cada glándula era determinada durante el ordeño mecánico en los diferentes controles experimentales utilizando medidores volumétricos (Figura III.3). En aquellos casos en los que la producción glandular era inferior a la lectura

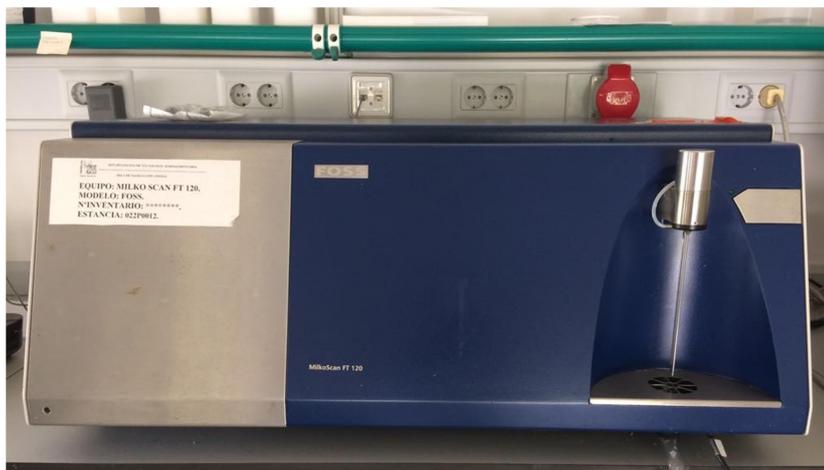
mínima del medidor, se echaba la leche en una probeta de 500 mL para medirla. Finalizado el ordeño de cada glándula y medida su producción, se cogieron las alícuotas de leche necesarias y representativas del volumen total ordeñado para los análisis posteriores de las variables descritas a continuación.

Figura III.3. A) Ordeño de las glándulas. B) Extracción de la leche del medidor.



2.2. Composición macroscópica y contenido mineral.

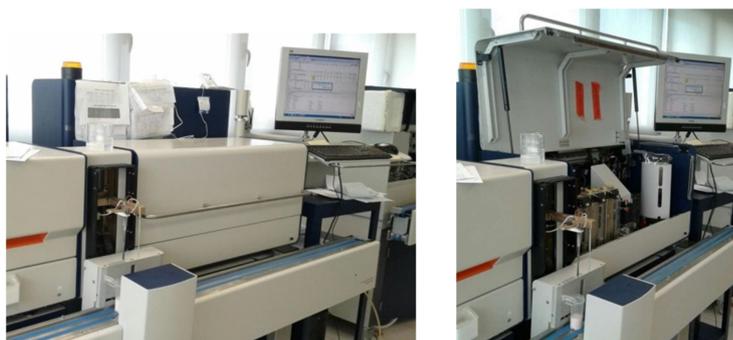
La composición macroscópica (Grasa (G), Caseína (Cas), Proteína del Suero (PS), Lactosa (Lac) y Cenizas (Cz)) se analizó mediante espectroscopía de infrarrojo medio (Milko Scan FT 120; Foss, Hillerød, Dinamarca) calibrado para leche de oveja (Figura III.4.), expresando los resultados en porcentaje sobre la materia húmeda. De forma periódica y a modo de comprobación, se realizaron análisis paralelos siguiendo los métodos de referencia para G (método Gerber, norma FIL 105, 1981); Cas y PS (Norma FIL 20B; 1993); Materia Seca (24h a $100\pm 2^{\circ}\text{C}$), Extracto Seco Magro, Cz y Lac siguiendo las normas del Ministerio de Agricultura (1974).

Figura III.4. Milko Scan FT 120.

El contenido en Na^+ y K^+ (mg/L) se determinó mediante fotometría de llama (PFP, JENWAY, Staffordshire, UK), mientras que para la determinación del contenido de Cl^- (mg/L) se utilizó el método de Mohr adaptado para leche (AOAC, 1995), realizando los análisis siempre la misma persona para evitar el efecto del operario.

2.3. Recuento de Células Somáticas (RCS).

El análisis del RCS ($\times 10^3$ cel/mL) se realizó en el Laboratorio Interprofesional de Leche de la Comunidad Valenciana (España), mediante el método opto-fluorométrico (Fossomatic 5000; Foss, Hillerød, Dinamarca; Figura III.5). Para ello, de la leche obtenida de cada glándula se separó una alícuota de 30 mL a la que se añadió azidiol para su conservación y posterior envío al laboratorio.

Figura III.5. Fossomatic 5000.

2.4. Conductividad Eléctrica (CE) de la leche.

Para la medida de la CE de la leche se utilizó un conductímetro de laboratorio (GLP 32, Crison, Alella, España) con compensación automática de temperatura a 25°C (Figura III.6). La sonda era de tipo conductiva con dos placas de platino planas paralelas entre sí (Modelo 52-92, Crison Instruments, Alella, España). La compensación de la lectura a 25°C se realizaba mediante una sonda de temperatura PT 1000 (Modelo CAT tipo Pt 1000, Crison Instruments, Alella, España). Este conductímetro era calibrado diariamente con patrones 1413 $\mu\text{S}/\text{cm}$. y 12,88 mS/cm.

Figura III.6. Conductímetro de laboratorio GLP 32.



2.4.1. Medida de la CE “on-line”.

Para la medida automática de la CE se utilizó un prototipo intercalado en el tubo corto de leche desarrollado en conjunto por investigadores del grupo de investigación “Genética, Bienestar, Calidad y Seguridad Alimentaria en Producción Animal” del Departamento de Tecnología Agroalimentaria e investigadores del Departamento de Ingeniería de Sistemas Industriales, área de Ingeniería de Sistemas y automatismos de la Universidad Miguel Hernández.

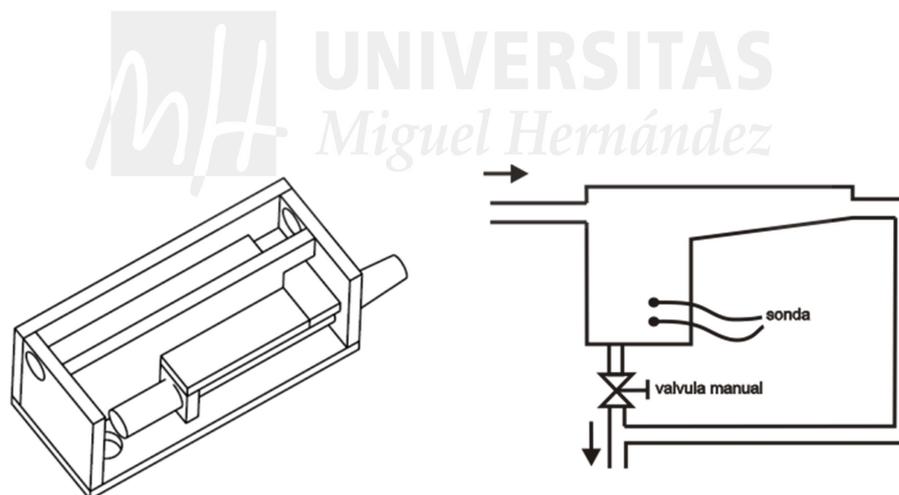
El prototipo constaba de un conductímetro (modelo GLP31, *Crison Instruments*, Alella, España) con sonda de CE conductiva de anillos de platino modelo 52-93 (*Crison Instruments*, Alella, España) y sonda de temperatura integrada tipo PT1000, con un rango de medición de CE de 2 a 199,9 mS/cm y coeficiente de compensación de temperatura del 2%/°C (la temperatura de compensación era de 25°C) y un habitáculo fabricado en

cianocrilato y metacrilato (Figura III.7), en el que se alojó la sonda de medición. El conjunto formado por la sonda y el habitáculo fueron intercalados en el tubo corto de leche (Figura III. 8a), lo que permitía medir la CE de la leche glandular a medida que era extraída.

Los habitáculos donde se ubicaban las sondas estaban provistos de tres orificios cuyas funciones eran:

- 1) Permitir la entrada de la leche recogida por el tubo corto al mismo tiempo que era ordeñada.
- 2) Permitir la evacuación de la leche (o su acumulación si se cerraba la válvula con la que estaba provisto).
- 3) Permitir la transmisión de vacío hasta las pezoneras y la extracción de la leche cuando se cerraba la válvula para acumular ésta en el interior del habitáculo.

Figura III. 7. Esquema del habitáculo del prototipo.



Las dimensiones de la cámara de medición eran de:

- 45×25×25 mm (dimensiones interiores: longitud/altura/profundidad),
- y de 132×60×60 mm (dimensiones exteriores: longitud/altura/profundidad).

Para realizar las medidas de CE, se cerraba la válvula manual de la cámara de llenado hasta que ésta estaba completamente llena. A continuación se abría la válvula para permitir la evacuación de la leche, cerrándola seguidamente para provocar de nuevo el llenado de la cámara, repitiendo esta rutina hasta el final del ordeño de la glándula. El

conductímetro recogía medidas de CE cada segundo, las cuales se volcaban a un ordenador conectado a la sonda de medición donde eran almacenados en archivos de texto por separado según el día de toma de muestras, glándula ordeñada y tipo de ordeño (mañana o tarde) (Figura III. 8b). Los datos tomados por el prototipo eran grabados por el software proporcionado por la empresa fabricante (*Crison Instruments*, España) y almacenados en formato texto, por lo que fue necesaria la transformación a datos numéricos mediante el empleo de la hoja de Cálculo Excel (*Microsoft Office*, 2013). Posteriormente fueron procesados mediante el *software* informático MATLAB para obtener a partir de ellos un valor diario para cada glándula y ordeño. Éste valor único se obtuvo como la media de los máximos locales de cada ordeño, siendo los máximos locales los valores de CE máxima registrados en cada llenado de la cámara de medición a lo largo del ordeño de cada glándula, valor correspondiente al momento de llenado máximo de la cámara.

Figura III.8. A. Ordeño de las glándulas y medida de la CE con el prototipo de conductímetro para la medida on-line. B. Ordenador para la recogida de datos.



2.5. Análisis bacteriológico.

La recogida de muestras de leche para su análisis bacteriológico se realizaba en cada control antes del ordeño de la mañana. Para ello, se limpiaba y desinfectaba el pezón con etanol al 70% y, tras desechar los primeros chorros, se recogía una muestra de leche en tubos estériles para su posterior análisis.

Figura III.9. Recogida de muestras para el análisis bacteriológico.



Inmediatamente después de la recogida aséptica de la leche, se sembraron 20 μL de leche por agotamiento bajo campana de flujo laminar en placas de Agar-sangre de oveja (Biomérieux, Lyon, Francia) que fueron incubadas a 37°C. El recuento del crecimiento bacteriano se realizó transcurridas 24, 48 y 72 h desde la siembra.

La clasificación entre cultivo positivo o negativo se realizó teniendo en cuenta las recomendaciones del National Mastitis Council (Harmon *et al.* 1990); se consideró que el cultivo era positivo al observarse un crecimiento de al menos 5 unidades formadoras de colonia por placa (u.f.c./placa), y negativo si no había crecimiento o era inferior al valor comentado transcurridas 72 h de la siembra. Los casos en los que se observó crecimiento simultáneo de varias colonias se clasificaron como cultivos mixtos cuando se observaron dos microorganismos de morfología colonial diferente (más de 5 u.f.c./placa de cada uno) y su distribución fue equitativa desde la zona de inoculación inicial y a lo largo de las estrías de la siembra, sugiriendo la implicación de ambos en la infección de la glándula. Si

el crecimiento fue de tres o más colonias distintas, el cultivo se clasificó como contaminado.

En las muestras que resultaron positivas se aislaron los microorganismos y fueron congelados en leche con glicerol al 2% a -4°C hasta la finalización de los experimentos, momento en el que se realizó la identificación del género bacteriano. Esta identificación se efectuó mediante la tinción de Gram y la prueba de catalasa en aquellas colonias de morfología compatible con microorganismos Gram positivos. Por último, en el caso de los estafilococos se realizó la identificación de la especie bacteriana mediante el empleo del kit Apistah (Bio Merieux, Francia), mientras que los compatibles con enterobacterias se identificaron mediante el kit BBL Enterotube II, (BD Diagnostic Systems, Alemania).

3. DEFINICIÓN DEL ESTADO SANITARIO DE LAS GLÁNDULAS.

Las glándulas fueron clasificadas en diferentes estados sanitarios, en función de los resultados del análisis bacteriológico y el RCS. Las glándulas con análisis bacteriológico positivo en dos o más controles seguidos se clasificaron como glándulas con mamitis infecciosa cuando el RCS fue superior a 400×10^3 cel/mL, y glándulas con infección latente cuando el RCS se mantuvo inferior a 400×10^3 cel/mL. Las glándulas en las que el análisis bacteriológico fue negativo y el RCS fue inferior a 400×10^3 cel/mL se clasificaron como glándulas sanas. No se observaron casos en los que el RCS fuese superior a 400×10^3 cel/mL con análisis bacteriológico negativo.

**IV. FACTORES DE VARIACIÓN DE LA
CONDUCTIVIDAD ELÉCTRICA
EN LECHE DE OVEJAS MANCHEGAS.**



IV. FACTORES DE VARIACIÓN DE LA CONDUCTIVIDAD ELÉCTRICA EN LECHE DE OVEJAS MANCHEGAS.

Con el objetivo de estudiar los factores de variación que afectan a la CE de la leche de las glándulas mamarias en ganado ovino como método de detección de mastitis, se plantearon dos experimentos.

En el Experimento 1, se estudió el efecto de diversos factores no infecciosos (estado de lactación, sesión de ordeño, número de lactación y composición de la leche) e infecciosos en la CE. Este experimento ha sido publicado en la revista internacional *Journal of Dairy Science* (Romero, G.; Roca, A.; Alejandro, M.; Muelas, R. and Díaz, J.R. 2017. Relationship of mammary gland health status and other noninfectious factors with electrical conductivity of milk in Manchega ewes. *J. Dairy Science*, 100:1555–1567. <https://doi.org/10.3168/jds.2016-11544>).

En el Experimento 2, se estudió el efecto de la fracción de ordeño (primeros chorros, leche máquina y leche de apurado) junto con el estado sanitario de las glándulas y el número de parto en la CE de la leche. Así mismo, también se estudió la relación de la CE con la composición de la leche (macrocomposición y contenido mineral) y la relación existente entre la CE y el RCS. Este experimento ha sido enviado para su publicación, estando actualmente en fase de revisión. (Roca, A.; Romero, G.; Alejandro, M.; Muelas, R. and Díaz, J.R. Milk electrical conductivity in Manchega ewes: evolution throughout milking and relationship with mastitis).

IV. 1. EXPERIMENTO 1. RELACIÓN DEL ESTADO SANITARIO DE LA GLÁNDULA Y OTROS FACTORES NO INFECCIOSOS CON LA CE DE LA LECHE DE OVEJAS MANCHEGAS.

1. INTRODUCCIÓN.

La mamitis en ovino lechero, tanto clínica como subclínica, produce pérdidas económicas debido a la disminución de la producción y del rendimiento quesero (Leitner *et al.*, 2008). A todo esto, hay que sumar los gastos producidos por el coste de los tratamientos, las pérdidas por los periodos de retirada de leche tras la aplicación de dichos tratamientos e incluso en algunos casos la mamitis produce la muerte del animal, o pérdida completa de una o varias glándulas.

En ganado ovino, las pérdidas de producción debidas a mamitis subclínicas puede llegar a ser del 12,2% en rebaños con un 75% de glándulas infectadas, mientras que con el mismo porcentaje de glándulas infectadas, las pérdidas en ganado caprino son sólo del 2,3% (Leitner *et al.*, 2008); la alteración de la composición de la leche y su consecuente disminución del rendimiento quesero también es más acusado en esta especie que en ganado vacuno o caprino (Leitner *et al.*, 2011). Debido a ello, en ganado ovino es de gran importancia el desarrollo de técnicas que permitan una detección temprana y eficaz de los casos de mamitis, que ayuden a minimizar las pérdidas económicas que conlleva dicha enfermedad.

La conductividad eléctrica (CE) de la leche durante el ordeño ha sido ampliamente estudiada en ganado vacuno como método de detección de mamitis susceptible de ser automatizado, obteniendo en algunos casos altos valores de Se y Sp (92% y 93%, respectivamente; Cavero *et al.*, 2006).

En pequeños rumiantes son escasos los trabajos publicados acerca del efecto de la mamitis en la CE de la leche, siendo algunos resultados contradictorios. En estudios recientes realizados en cabras Murciano-Granadinas, Díaz *et al.* (2011) observaron que además del estado sanitario de las glándulas, la CE de la leche también se ve afectada por el estado de lactación del animal, el número de parto y la granja de procedencia de las cabras. En el mismo estudio, los autores establecieron una serie de umbrales absolutos de CE (5, 5,10, 5,20, 5,30, 5,40, 5,50, 5,60, 5,70, 5,80, 5,90 y 6,00 mS/cm) para la detección de mamitis, encontrando variaciones importantes en cuanto a la sensibilidad (Se) y la

especificidad (Sp) obtenidas para un mismo umbral dependiendo de la granja. Romero *et al.* (2014), proponen una serie de algoritmos para la detección de mamitis a partir de la medida diaria e individual de la CE de la leche glandular, siendo capaces de clasificar todos los casos de mamitis clínica, aunque obtuvieron diferentes valores en los casos subclínicos. La mayor Se (58,3%) la obtuvieron al considerar como positivos aquellos casos en los que la CE se desviaba al menos tres veces la desviación típica por encima de la media móvil de los cuatro días anteriores. La Sp varió entre el 75 y el 100%, según el algoritmo. Romero *et al.* (2012), también en caprino, obtuvieron una Se del 70% y una Sp del 50% con un umbral de CE de 5,20 mS/cm independientemente de la fracción de ordeño estudiada. Zaninelli *et al.* (2015) evaluaron el uso del análisis del espectro de Fourier de la lectura “on-line” de la CE de la leche glandular como método de detección de mamitis, concluyendo que en las glándulas mamíticas la CE presenta fluctuaciones más lentas y una tendencia irregular, por lo que los picos de frecuencia obtenidos mediante la transformada de Fourier podrían ser usados como indicadores de mamitis y ser incluidos en el diseño de algoritmos para la detección de mamitis mediante la lectura de CE “on-line”.

En ganado ovino los estudios son muy escasos. Peris *et al.* (1989) observaron que la mamitis provoca un incremento de la CE de la leche y propusieron dos umbrales para la detección de mamitis. Uno de ellos de 5 mS/cm para diagnosticar las glándulas con mamitis, logrando una sensibilidad del 60,2% y una Sp del 91,4%, con un 87,9% de las muestras clasificadas correctamente. El otro umbral consistía en utilizar una diferencia de CE entre las dos glándulas del mismo animal de 0,3 mS/cm, encontrando mejores resultados (70% de sensibilidad, 93% de Sp y 89,1% de muestras clasificadas correctamente). Este umbral es similar al obtenido por Barth *et al.* (2008), quienes observaron una diferencia de CE entre glándulas de 0,1 mS/cm en ovejas sanas, y de 0,4 mS/cm entre glándulas de ovejas con una glándula infectada. McDougall *et al.* (2002), aunque no encontraron diferencias significativas entre la impedancia (propiedad inversa de la CE) de glándulas sanas e infectadas, sí obtuvieron una correlación negativa entre la impedancia y el RCS ($r = -0,27$), por lo que dedujeron que el aumento de RCS estará relacionado con un aumento de la CE. Caria *et al.* (2016) obtuvieron, en ovejas Sargas, una correlación positiva ($r = 0,31$) entre la CE y el recuento de células somáticas (RCS). En el mismo estudio, lograron una sensibilidad de 73,08% y una Sp de 75,46% estableciendo un umbral de CE de 4,84 mS/cm, por lo que utilizaron ese umbral en la evaluación de un

prototipo diseñado para la detección de mamitis subclínica mediante la medición “on-line” de la CE de la leche.

Con el fin de conocer los factores que afectan a la medida de la CE como método de detección de mamitis, se planteó este experimento con el objetivo de estudiar el efecto de diversos factores no infecciosos (estado de lactación, sesión de ordeño y número de lactación) e infecciosos en la CE de leche glandular de ganado ovino. Así mismo, también se estudió la relación de la CE con la composición de la leche (macrocomposición y contenido mineral) y la relación existente entre la CE y el RCS.

2. MATERIALES Y MÉTODOS.

2.1. Lugar de realización y animales utilizados.

El experimento se realizó en la Granja Docente de Pequeños Rumiantes de la Escuela Politécnica Superior de Orihuela, perteneciente a la Universidad Miguel Hernández de Elche (España).

Se utilizaron ovejas de raza Manchega, raza autóctona de España con una media de producción por oveja de 1,156 L/día (Arias *et al.*, 2012). La leche de esta raza de aptitud mixta se destina principalmente a la elaboración de queso Manchego. El queso manchego y el cordero manchego, son dos productos de gran valor amparados por la Denominación de Origen Geográfica Protegida e Indicación de Geográfica Protegida, respectivamente.

El sistema de explotación practicado era el intensivo, con estabulación permanente. El ritmo reproductivo fue de un parto anual, con destete de los corderos al nacimiento y alimentación de éstos mediante lactancia artificial. Tras el parto, las ovejas pasaron a ordeñarse dos veces al día (8:00 y 16:00h) en una sala de ordeño de línea baja tipo Casse 1x12x12 con los siguientes parámetros de ordeño: 36 kPa de nivel de vacío, 180 pulsaciones por minuto y 50% de relación de pulsación.

La dieta, consistente en 2,5 kg diarios de mezcla “unifeed” y paja “ad libitum” se mantuvo constante a lo largo de la lactación. El agua era suministrada a voluntad en bebederos de cazoleta con boya de nivel constante.

2.2. Diseño experimental.

Durante dos lactaciones se controlaron 42 (22 primíparas y 20 multíparas) y 40 (3 primíparas y 37 multíparas) ovejas, respectivamente. Se realizaron 7 controles de frecuencia quincenal, siendo el primero a los quince días del parto, con lo que la toma de muestras tuvo una duración de tres meses y medio. Las muestras se tomaron en el ordeño de la mañana (8:00h) y en el ordeño de la tarde (16:00h).

En cada control se tomaron dos muestras de cada glándula en el ordeño de la mañana (5 y 100 mL), y una de 100 mL en el de la tarde. La primera del ordeño de la mañana fue utilizada para el análisis bacteriológico y se obtuvo antes del ordeño de forma aséptica en tubos estériles tras limpiar los pezones con etanol al 70% y eliminar los primeros chorros. A continuación, las glándulas se ordeñaron mecánicamente por separado recogiendo la leche en medidores volumétricos, se midió la producción con una probeta de 500 mL y se recogió una muestra de 100 mL representativa del total de leche ordeñada de cada glándula que se empleó para la posterior medida de la CE, el RCS, macrocomposición de la leche y el contenido mineral.

2.3. Variables analizadas.

Para el análisis bacteriológico, inmediatamente después de su recogida se sembraron 20 μ L de leche en placas de Agar-sangre de oveja (Biomerieux, Lyon, Francia) que fueron incubadas a 37°C, realizándose un recuento del crecimiento bacteriano transcurridas 24, 48 y 72h desde la siembra. Para la clasificación entre cultivo positivo o negativo se tuvieron en cuenta las recomendaciones del National Mastitis Council (Harmon *et al.* 1990); se consideró que el cultivo era positivo al observarse un crecimiento de al menos 5 colonias idénticas por placa, y negativo si no había crecimiento transcurridas 72h de la siembra. La identificación del género bacteriano se efectuó mediante la tinción de Gram y la prueba de catalasa en aquellas colonias de morfología compatible con microorganismos Gram positivos. Por último, en el caso de los estafilococos se realizó la identificación de la especie bacteriana mediante el empleo del kit Apistah (Bio Merieux, Francia).

La CE (mS/cm) se midió inmediatamente después de su recogida con un conductímetro de laboratorio (GLP 32, Crison, Alella, España) con compensación automática de temperatura a 25°C.

Tras la medida de la CE se separó una alícuota de 30 mL a la que se añadió azidol para su conservación y en la que se midió el RCS ($\times 10^3$ cel/mL) en el Laboratorio Interprofesional de Leche de la Comunidad Valenciana (España), mediante el método fluorométrico (Fossomatic 5000; Foss, Hillerød, Dinamarca).

La composición macroscópica (grasa, caseínas, proteínas del suero, lactosa y cenizas) se analizó mediante espectroscopía de infrarrojo (Milko Scan FT 120; Foss-electric, Hillerød, Dinamarca), expresando los resultados en porcentaje sobre la materia húmeda.

El contenido en sodio (Na^+) y potasio (K^+) (mg/L) se determinó mediante fotometría de llama, (PFP, JENWAY, Staffordshire, UK). Para la determinación del contenido en cloruro (Cl^-) (mg/L) se utilizó el método de Mohr adaptado para leche (AOAC, 1995), realizando los análisis siempre la misma persona para evitar el efecto del operario.

2.4. Definición del estado sanitario de las glándulas.

Las glándulas fueron clasificadas según el estado sanitario, en función de los resultados del análisis bacteriológico y el RCS. Las glándulas con análisis bacteriológico positivo en dos o más controles seguidos se clasificaron como glándulas con mamitis infecciosa cuando el RCS fue superior a 400×10^3 cel/mL, y glándulas con infección latente cuando el RCS se mantuvo inferior a 400×10^3 cel/mL. Las glándulas en las que el análisis bacteriológico fue negativo se clasificaron como glándulas sanas (no hubo glándulas con análisis bacteriológico negativo y $\text{RCS} > 400 \times 10^3$ cel/mL). Para la clasificación de las glándulas, se estableció un umbral de RCS de 400×10^3 cel/mL en base a la bibliografía consultada y la experiencia previa del grupo de investigación.

2.5. Análisis estadístico.

Con el fin de normalizar la distribución de los datos y poder aplicar los análisis estadísticos las variables CE y RCS se transformaron en el logaritmo base 10 (LCE, LRCS).

Se analizó la relación de las variables LCE y LRCS con los efectos fijos estudiados mediante un Modelo Lineal Mixto (Proc Mixed, SAS V. 9.2, SAS Institute, 2012). La producción de la glándula (PROD) se incluyó como covariable y se consideraron los

siguientes efectos fijos: el estado sanitario de las glándulas (INF_i , con 3 niveles: sanas, con mamitis infecciosa, o con infección latente); la sesión de ordeño (ORD_j , con 2 niveles: matutino o vespertino); el número de parto (NL_k , con 2 niveles: multíparas o primíparas); el estado de lactación ($CONT_l$, con 7 niveles: 2 semanas después del parto, 4 semanas...14 semanas) y las interacciones entre el estado sanitario de las glándulas y el número de lactación, el estado sanitario de las glándulas y el estado de lactación y el número de lactación y el estado de lactación. Los efectos aleatorios considerados fueron el año del experimento (1, 2) y la glándula (derecha o izquierda) anidado a la oveja, para modelizar la covarianza entre las observaciones de las glándulas dentro de cada oveja (Barkema *et al.*, 1997). Se utilizó un modelo de ajuste de la correlación de la varianza entre medidas repetidas del mismo animal de tipo “Compound Symmetry”, al ser el que mejor ajuste presentó de acuerdo a los Aikake Iteration Criterion (AIC) y Bayesian Iteration Criterion (BIC).

Algunas muestras resultaron dañadas durante su transporte al laboratorio, por lo que el número de observaciones utilizadas en el modelo fue menor para el RCS que para la CE.

Las interacciones de la sesión de ordeño con el número de parto y del tipo de ordeño con el estado sanitario de las glándulas no fueron significativas, por lo que no se incluyeron en el modelo final.

Se analizó la correlación de la CE con el RCS (Proc Corr, SAS V.9.2. SAS Institute, 2012) según cuatro intervalos de RCS ($RCS < 200.000$, $200.000 \leq RCS < 400.000$, $400.000 \leq RCS < 600.000$ y $RCS \geq 600.000$ cel/mL). Se analizó la relación entre la composición de la leche (grasa, caseínas, lactosa, proteína del suero, cenizas y contenido en cloro, sodio y potasio) y la CE (Proc Reg, SAS V.9.2. SAS Institute, 2012).

Se calculó la evolución de la sensibilidad y especificidad para la detección de mamitis en función de distintos umbrales de CE, para el conjunto de datos y en función de la sesión de ordeño, y del número de lactación de los animales. Se definió la sensibilidad (Se) como el porcentaje de casos positivos que el método es capaz de detectar o la probabilidad de que una muestra positiva sea clasificada como tal (verdaderos positivos respecto de la suma de verdaderos positivos y falsos negativos). La especificidad (Sp) como el porcentaje de casos negativos que el método es capaz de detectar o la probabilidad de que una muestra negativa sea clasificada como tal (verdaderos negativos respecto a la suma de verdaderos negativos y falsos positivos). El valor predictivo positivo (VPP) se definió como la probabilidad de que una glándula esté infectada cuando la muestra es

clasificada como positiva (verdaderos positivos respecto a la suma de los verdaderos positivos y falsos positivos). Y por último, el valor predictivo negativo (VPN) se definió como la probabilidad de que una glándula no esté infectada cuando la muestra es clasificada como negativa (verdaderos negativos respecto a la suma de verdaderos negativos y falsos negativos).

3. RESULTADOS.

3.1. Incidencia y prevalencia de la infección.

En la Tabla IV.1 se muestra la prevalencia de la infección a lo largo de las dos lactaciones en las que se realizó el experimento. Al inicio del primer año, 7 de las 81 glándulas fueron clasificadas como glándulas infectadas (prevalencia del 8,64%), presentando 4 de ellas mamitis infecciosa y 3 infección latente, perteneciendo las 7 a ovejas multíparas. A lo largo de la lactación, se curó una de las glándulas con mamitis infecciosa y se infectaron 10 glándulas que al inicio estaban sanas: 5 de mamitis infecciosa y 5 de infección latente, curándose 1 caso de cada tipo, con lo que al final de la lactación la prevalencia global fue del 17,28%. De los casos nuevos que aparecieron, 4 pertenecían a ovejas primíparas, (incidencia del 9,52%,) y 6 a multíparas (incidencia del 18,75%).

Al inicio del segundo año, 9 glándulas presentaron mamitis infecciosa, y otros 9 casos presentaron infección latente, por lo que la prevalencia fue del 23,08%. A lo largo del experimento se curan 8 de las 9 glándulas que en el primer control presentaron infección latente, pero aparecieron 10 casos nuevos, de los cuales 5 se curaron en controles posteriores. En cuanto a las mamitis infecciosas, se curaron 3 glándulas de las que en principio estaban infectadas y apareció 1 caso nuevo que también se curó de forma espontánea. En total se infectaron 11 glándulas a lo largo de la lactación (incidencia del 18,33%), pero debido a que algunas se curaron, la prevalencia de la infección al final del segundo año (16,67%) fue inferior a la obtenida al inicio del experimento.

Tanto las mamitis infecciosas como las infecciones latentes cursaron de forma subclínica, incluso las producidas por patógenos sensibles a la novobiocina. Al no detectarse ninguna mamitis clínica, no se aplicó ningún tratamiento antibiótico a ninguna oveja. Por lo que las glándulas que al inicio de la lactación presentaron mamitis infecciosa o una infección latente y se curaron a lo largo de la lactación, lo hicieron espontáneamente.

Tabla IV.1. Estado sanitario de las glándulas y ovejas al inicio y al final de la lactación.

		Año 1				Año 2							
		Inicio lactación		Final lactación		Inicio lactación		Final lactación					
		Ovejas	Glándulas	Ovejas	Glándulas	Ovejas	Glándulas	Ovejas	Glándulas				
Primíparas	Sanas	20+2 ¹	42	19+2 ¹	40	3	6	3	6				
	Infectadas	Uni ⁴	Bil ⁵										
		-	-	-	1	2	-	-	-	-			
	Infección latente	Uni ⁴	Bil ⁵										
		-	-	-	-	-	-	-	-	-			
	Total	20+2¹	42	20+2¹	42	3	6	3	6				
Multíparas	Sanas	13+1 ¹	27+5 ²	10+1 ¹	21+6 ²	24+2 ¹	50+4 ²	26+2 ¹	54+6 ²				
	Infectadas	Uni ⁴	Bil ⁵										
		4	-	4	3	1	5	3	2+2 ³	9	3	1+1 ³	6
	Infección latente	Uni ⁴	Bil ⁵										
		1	1	3	3	2	7	1	3+2 ³	9	3	1+1 ³	6
	Total	19+1¹	39	19+1¹	39	35+2¹	72	35+2¹	72				
Total	Sanas	33+3 ¹	71+5 ²	29+3 ¹	61+6 ²	27+2 ¹	56+4 ²	29+2 ¹	60+6 ²				
	Infectadas	Uni ⁴	Bil ⁵										
		4	-	4	3	2	7	3	2+2 ³	9	3	1+1 ³	6
	Infección latente	Uni ⁴	Bil ⁵										
		1	1	3	3	2	7	1	3+2 ³	9	3	1+1 ³	6
	Total	39+3¹	81	39+3¹	81	38+2¹	78	38+2¹	78				

1. Ovejas que poseen una sólo glándula funcional.
2. Glándulas sanas de ovejas con infección unilateral.
3. Ovejas que presentan mamitis infecciosa en una glándula e infección latente en la otra glándula.
4. Uni: Ovejas con mamitis infecciosa o infección latente en una sola glándula.
5. Bil: Ovejas con mamitis infecciosa o infección latente en ambas glándulas.

3.2. Patógenos aislados durante el experimento.

En la Tabla IV. 2 se muestra la CE y el RCS en función del patógeno causante de la infección. La CE media de las glándulas libres de infección fue de 4,17 mS/cm. El 97,4% de los patógenos aislados fueron estafilococos, siendo *S. xylosus* y *S. lentus*, los que se aislaron en un La CE media de las glándulas libres de infección fue de 4,17 mS/cm. mayor número de casos. El mayor RCS, así como la CE más elevada se registraron en el caso de glándulas infectadas por *S. aureus* (5,73 mS/cm y 15.601 x 10³ cel/mL), seguidos por los valores observados en glándulas infectadas por *S. xylosus* (4,61 mS/cm y 2.989 x 10³ cel/mL), mientras que *S. haemolytica* incrementa la CE pero no el RCS (4,48 mS/cm y 102 x 10³ cel/mL).

Tabla IV. 2. CE y RCS (Media \pm SD) de la leche glandular en función del tipo de patógeno causante de la infección.

Patógeno	CE (mS/cm)	n	RCS (x 10 ³ cel/mL)	n
Glándulas sanas	4,17 \pm 0,43	1882	304 \pm 1.318	1804
<i>Staphylococcus</i> spp.	4,41 \pm 0,68	68	452 \pm 1.082	61
<i>S. xylosus</i>	4,61 \pm 0,64	92	2.989 \pm 5.953	85
<i>S. aureus</i>	5,73 \pm 1,31	10	15.601 \pm 9.075	9
<i>S. caprae</i>	4,21 \pm 0,42	19	1.337 \pm 1.775	14
<i>S. lentus</i>	4,14 \pm 0,45	63	572 \pm 2.839	66
<i>S. haemolytica</i>	4,48 \pm 0,54	6	102 \pm 39	5
<i>S. sciuri</i>	4,09 \pm 0,28	6	163 \pm 161	7
Enterobacterias	4,03 \pm 0,16	7	228 \pm 186	6

n: números de glándulas.

3.3. Factores asociados con la CE y el RCS en leche.

Como se muestra en la Tabla IV. 3, todos los factores considerados y sus interacciones resultaron significativos para ambas variables, aunque no se vieron afectadas del mismo modo por ellos. En el caso de la CE, el principal responsable de sus variaciones fue la sesión de ordeño, seguido del estado de lactación y el estado sanitario de las glándulas. Por el contrario, en el caso del RCS fueron el estado sanitario de las glándulas y la producción los que mayor efecto provocaron, seguidos del tipo de ordeño. Tanto la CE como el RCS se vieron afectadas por la producción de las glándulas, siendo ambas variables mayores a medida que disminuyó la producción.

Tabla IV.3. Resultado del análisis estadístico (valor F y nivel de significación) de las variables LCE y LRCS.

EFEECTO	Niveles	LCE (n = 2.138)	LRCS (n = 1.901)
Producción		6,65**	30,04***
Estado de lactación	7	23,34***	7,99***
Número de lactación	2	16,57***	10,32**
Ordeño	2	328,98***	23,68***
Estado sanitario	3	22,77***	39,88***
Número de lactación x Estado sanitario	6	3,57*	7,04***
Estado de lactación x Estado sanitario	21	6,09***	5,10***
Número de lactación x Estado de lactación	14	5,36***	3,75**

LCE: logaritmo de conductividad eléctrica. LRCS: logaritmo del recuento de células somáticas. n = Número de observaciones utilizadas. * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$.

En la Tabla IV. 4 se muestran las medias de LCE y LRCS obtenidas en función de la sesión de ordeño. En el ordeño de la mañana se registró una CE significativamente superior ($P < 0,001$) a la del ordeño de la tarde (4,34 vs 4,08 mS/cm), por el contrario, el RCS obtenido en el ordeño de la tarde (162×10^3 cel/mL) fue significativamente superior ($P < 0,001$) al de la mañana (129×10^3 cel/mL).

Tabla IV.4. Resultado de la comparación de medias de LCE y LRCS según el ordeño.

Ordeño	LCE (Media ± ES) (Antilog, mS/cm) n = 2.138	LRCS (Media ± ES) (Antilog, $\times 10^3$ cel/mL) n = 1.901
Mañana	0,6383 ± 0,0081 (4,34)	2,1121 ± 0,0498 (129)
Tarde	0,6115 ± 0,0081 (4,08)	2,2107 ± 0,0510 (162)
NS	***	***

LCE: logaritmo de la conductividad eléctrica. LRCS: logaritmo del recuento de células somáticas. NS: nivel de significación. *** $P < 0,001$. ES: Error estándar. n = Número de observaciones utilizadas.

En la Tabla IV.5 se muestran las medias de CE y RCS según el estado sanitario de las glándulas y el número de parto. La CE de las ovejas multíparas (4,37 mS/cm) fue significativamente mayor que la de las primíparas (4,07 mS/cm) al analizar todos los datos conjuntamente y al considerar el estado sanitario de las glándulas: en los tres casos (glándulas sanas, con mamitis infecciosa, o con infección latente) fue significativamente mayor la CE de ovejas multíparas que la de las ovejas primíparas. Tanto en las multíparas como en las primíparas, la CE de las glándulas con mamitis infecciosa fue significativamente mayor que la de las glándulas con infección latente o sanas. No obstante, la interacción del estado de infección con el número de parto fue significativa. En las ovejas primíparas, la CE de las glándulas con infección latente (3,77 mS/cm) fue significativamente menor que las de las glándulas sanas (4,08 mS/cm), mientras que en las ovejas multíparas esta diferencia no fue significativa.

De modo similar a lo sucedido con la CE y considerando los datos de forma global, el RCS fue significativamente mayor en las ovejas multíparas que en las primíparas (205 y 102 x 10³ cel/mL, respectivamente). El RCS fue significativamente superior en las ovejas multíparas que en las primíparas para las glándulas sanas e infectadas, pero no se obtuvieron diferencias significativas en el caso de glándulas con infección latente.

Tabla IV.5. LCE y LRCS según el número de parto y el estado sanitario de las glándulas.

	LCE (n = 2138)			LRCS (n = 1901)		
	Primíparas	Multíparas	NS	Primíparas	Multíparas	NS
	Media ± ES (Antilogaritmo, mS/cm)	Media ± ES (Antilogaritmo, mS/cm)		Media ± ES (Antilogaritmo, x10 ³ cel/mL)	Media ± ES (Antilogaritmo, x10 ³ cel/mL)	
Glándulas sanas	0,6110 ^a ± 0,0076 (4,08)	0,6224 ^a ± 0,0074 (4,19)	***	1,9172 ^a ± 0,0286 (82)	1,9972 ^a ± 0,0223 (99)	**
Glándulas con infección latente	0,5761 ^b ± 0,0188 (3,77)	0,6252 ^a ± 0,0078 (4,21)	**	1,7849 ^a ± 0,2256 (61)	1,9389 ^a ± 0,0426 (87)	ns
Glándulas infectadas	0,6415 ^c ± 0,0139 (4,38)	0,6736 ^b ± 0,084 (4,72)	*	2,3281 ^b ± 0,1498 (213)	3,0021 ^b ± 0,0539 (1005)	***

LCE: logaritmo de la conductividad eléctrica. LRCS: logaritmo del recuento de células somáticas. ES: Error estándar. NS: nivel de significación de la comparación de medias en la misma fila (ns: no significativo; *: P<0,05; **: P<0,01; ***: P<0,001); a b c; Diferentes superíndices en la misma columna indican diferencias significativas a P<0,05.

El estado de lactación tuvo un efecto significativo tanto en el RCS como en la CE. Los mayores valores de ambas variables se registraron en el primer control, realizado a las dos semanas del parto (276×10^3 cel/mL y 4,57 mS/cm). Se observó un descenso significativo de la CE en el segundo muestreo (cuarta semana de lactación) y a partir de entonces los valores se mantuvieron sin diferencias significativas hasta el final de lactación. El menor valor de CE se observó en la semana 10 de lactación (4,04 mS/cm) y posteriormente se observó un leve incremento, aunque sin diferencias significativas. En el caso del RCS el máximo valor se obtuvo en el primer muestreo (semana 2 tras el parto), para descender significativamente en el siguiente control, observándose el valor menor a las 12 semanas (95×10^3 cel/mL), el cual incrementó de forma no significativa a las 14 semanas (129×10^3 cel/mL).

En las Figuras IV.1 y IV.2 se muestra la evolución de la CE y el RCS a lo largo de la lactación en función del número de parto de las ovejas. La interacción del número de lactación con el estado de lactación fue significativa para la CE y el RCS. En el caso de la CE, esta interacción es poco relevante desde el punto de vista biológico. Tanto en primíparas como en múltiparas, los mayores valores de CE se registraron en el primer control (4,49 y 4,64 mS/cm, respectivamente) sin diferencias significativas entre ambos tipos de animales. En el segundo muestreo la CE descendió significativamente en ambos tipos de animales, siendo mayor el descenso en primíparas lo que ocasionó que se observaran diferencias entre primíparas y múltiparas. Estas diferencias se mantuvieron hasta el final del experimento, aunque ya no se observaron diferencias significativas entre muestreos.

El RCS de las ovejas múltiparas fue significativamente superior al de las primíparas durante todo el experimento, excepto en el último muestreo, donde no se observaron diferencias significativas. En general, el progreso de la lactación causó un descenso progresivo del RCS. Los valores más altos de RCS se registraron en el primer control (385 y 197×10^3 cel/mL en las múltiparas y primíparas respectivamente); el valor mínimo de RCS en las ovejas primíparas se obtuvo a las 12 semanas de lactación (57×10^3 cel/mL), y ascendió en el último muestreo, aunque de forma no significativa. En las ovejas múltiparas, el valor mínimo se alcanzó en la semana 14 de lactación (141×10^3 cel/mL).

Figura IV.1. Resultados de la comparación de medias del LCE a lo largo de la lactación en función del número de parto.

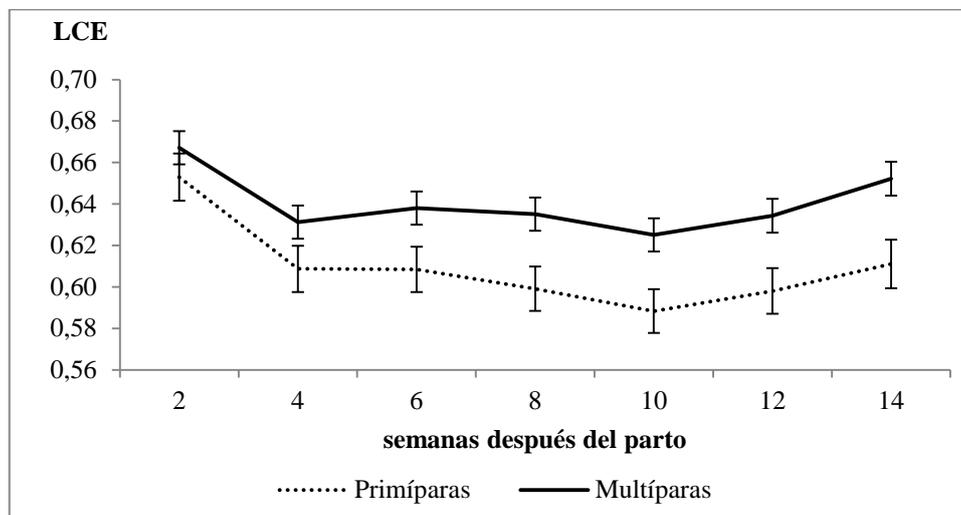
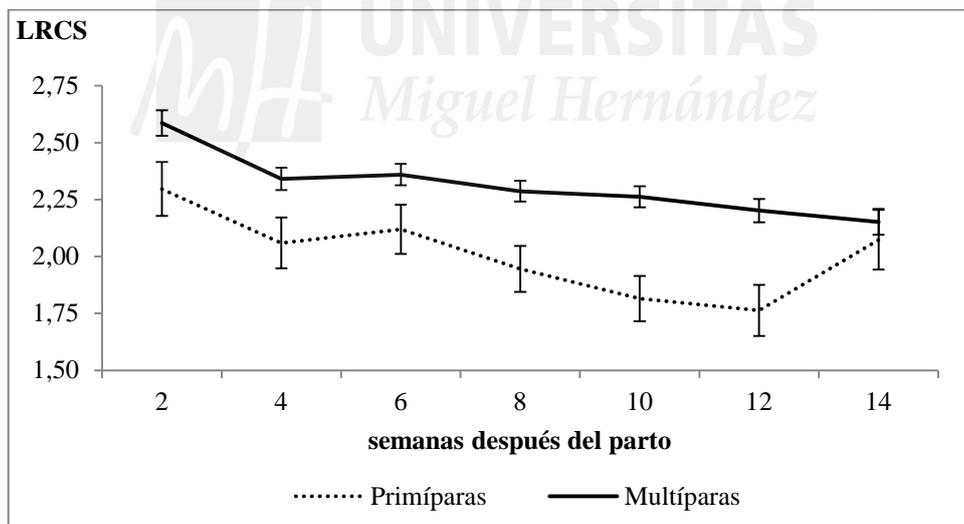


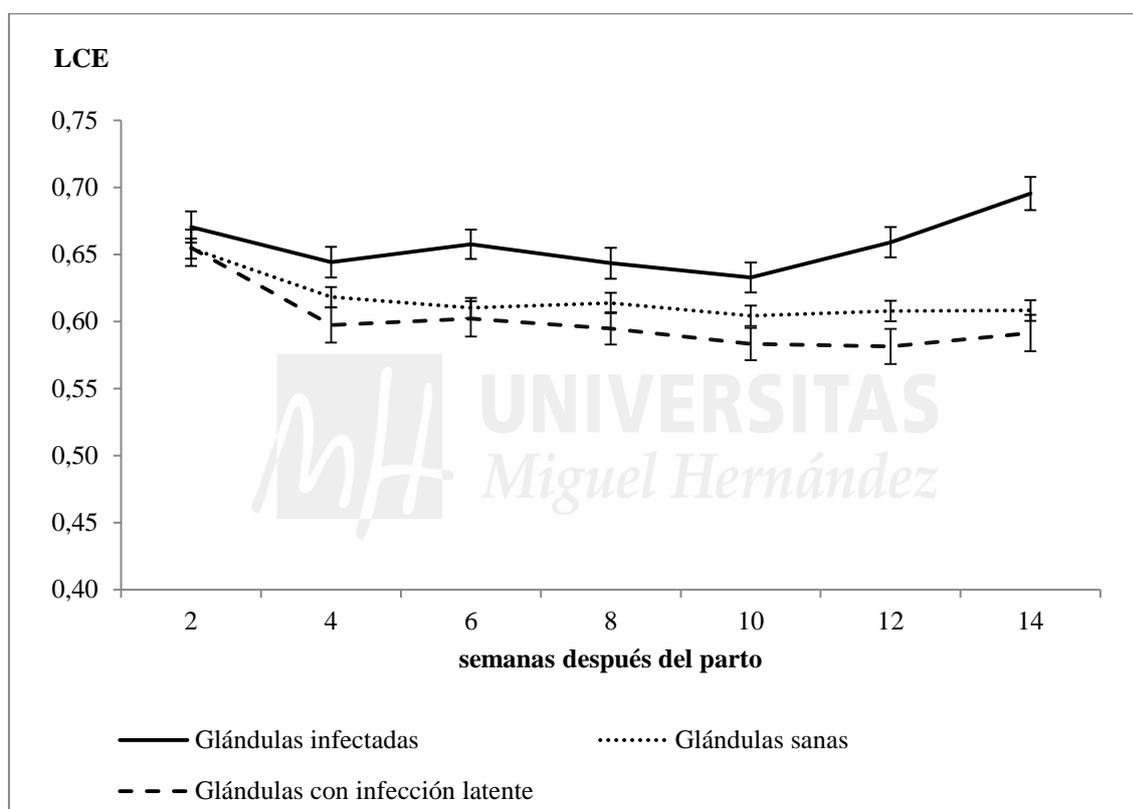
Figura IV.2. Resultados de la comparación de medias del LRCS a lo largo de la lactación en función del número de parto.



En la Figura IV.3 se muestra la evolución de la CE a lo largo de la lactación en función del estado sanitario de las glándulas. La CE de las glándulas con mamitis infecciosa fue significativamente superior a la de las sanas y las que presentaron infección latente durante toda la lactación, excepto en el primer control. En las glándulas con infección latente se registró una CE menor que en las glándulas sanas a lo largo de toda la lactación, pero esta diferencia solo fue significativa a las 8, 10 y 12 semanas del parto.

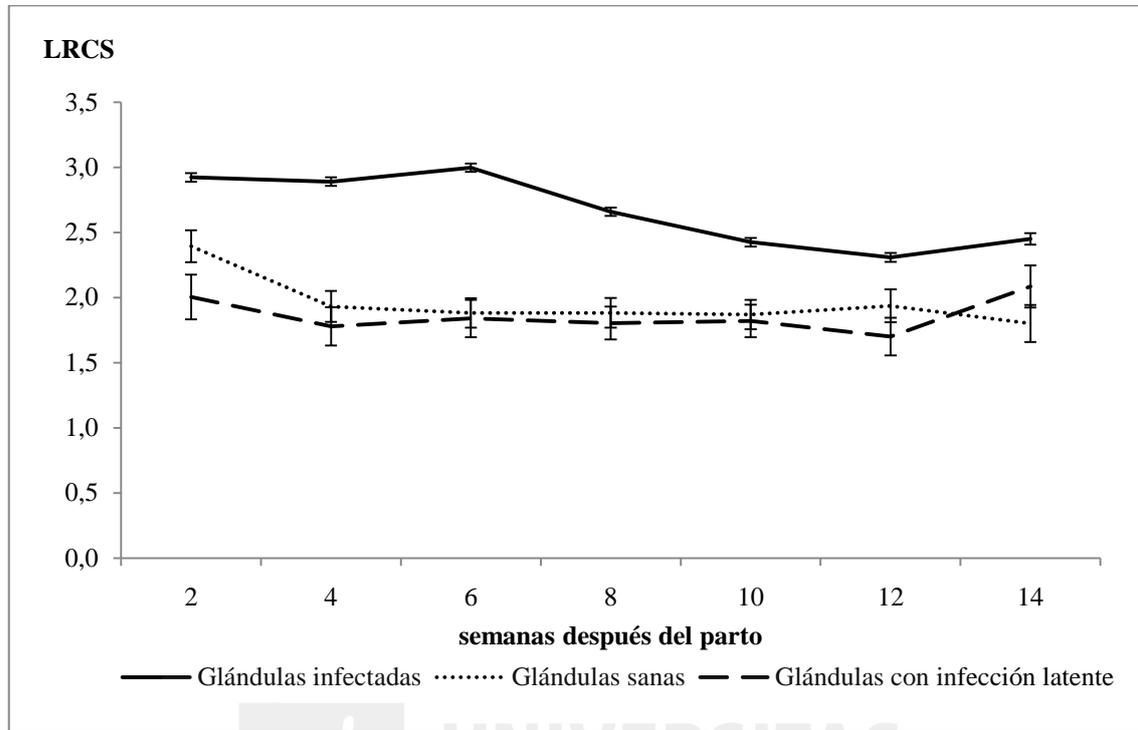
La evolución a lo largo de la lactación varió entre las glándulas con mastitis infecciosa y el resto. La CE descendió ligeramente en todos los tipos de estado sanitario a la semana 4 de lactación, aunque sin diferencias significativas, y se mantuvo estable hasta la semana 10. A partir de dicho momento la CE de las glándulas con mastitis infecciosa se incrementó hasta la semana 14 (alcanzando el valor máximo de CE: 4,96 mS/cm), mientras que el resto de estados sanitarios no observaron cambios de tendencia.

Figura IV.3. Resultados de la comparación de medias del LCE a lo largo de la lactación en función del estado sanitario de las glándulas.



En cuanto al RCS (Figura IV. 4), desde el primer control, donde se observaron diferencias significativas entre los tres estados sanitarios, el RCS de las glándulas con mastitis infecciosa fue significativamente mayor que el resto de estados sanitarios durante toda la lactación, no observándose diferencias entre glándulas sanas y con infección latente desde las 4 semanas de lactación hasta el final del experimento. El máximo valor de RCS de las glándulas con mastitis infecciosa se obtuvo a las 6 semanas de lactación, y el mínimo al final de lactación.

Figura IV.4. Resultados de la comparación de medias del LRCS a lo largo de la lactación en función del estado sanitario de las glándulas.



3.4. Correlación del RCS y la CE de la leche.

En la Tabla IV.6 se muestran los resultados del estudio de la correlación de la CE y el RCS. El coeficiente de correlación de la CE con el RCS, fue superior al analizar los datos conjuntamente ($r = 0,33$) que cuando se hizo por umbrales de RCS. El coeficiente de correlación solo fue significativo cuando el RCS $> 600 \times 10^3$ cel/mL y al analizar todos los datos en conjunto.

Tabla IV.6. Resultados del estudio de correlación de la CE y el RCS.

RCS ($\times 10^3$ cel/mL)	r	Número de observaciones
RCS<200	-0,03 ^{ns}	1520
200≤RCS<400	0,12 ^{ns}	140
400≤RCS<600	0,08 ^{ns}	62
RCS≥600	0,25***	186
Todos los datos	0,33***	1908

r: coeficiente de correlación; ns: No significativo; *P<0,05; **P<0,01; ***P<0,001.

3.5. Relación de la CE con la composición de la leche y el contenido mineral.

En la Tabla IV.7 se muestran los resultados del análisis de regresión realizado para estudiar la relación de la CE con la composición de la leche y el contenido mineral. Se obtuvo un alto coeficiente de determinación ($R^2 = 0,6901$). Las variables que explicaron la mayor varianza de la CE fueron la grasa ($R^2_{\text{parcial}} = 0,2416$), relacionada negativamente con la CE, y el contenido en Sodio y Potasio ($R^2_{\text{parcial}} = 0,1913$ y $0,0921$, respectivamente), cuya relación con la CE fue positiva. En menor medida también se relacionaron las variaciones de CE con el contenido en lactosa, las proteínas del suero y las caseínas de forma negativa y de forma positiva con el contenido en Cloruros.

Tabla IV.7. Relación entre la composición físico-química y la CE de la leche.

Variables	Estadístico			Modelo	
	Parámetro	ES	R^2_{parcial}		
Intercepto	10,3639	0,54156		n	1360
GRASA (%)	-0,1333	0,000023	0,2416		
SODIO (mg/L)	0,0009	0,000061	0,1913	F_{valor}	30,71
POTASIO (mg/L)	0,0005	0,000042	0,0921		
LACTOSA (%)	-1,2988	0,0066	0,0771	NS	P < 0,001
PROTEÍNAS DEL SUERO (%)	-0,972	0,0255	0,0467		
COLORURO (mg/L)	0,00031	0,1456	0,0342	R²	0,6901
CASEÍNAS (%)	-0,1413	0,0959	0,0070		

ES: error estándar; R^2 : coeficiente de regresión; NS: nivel de significación; n: número de observaciones.

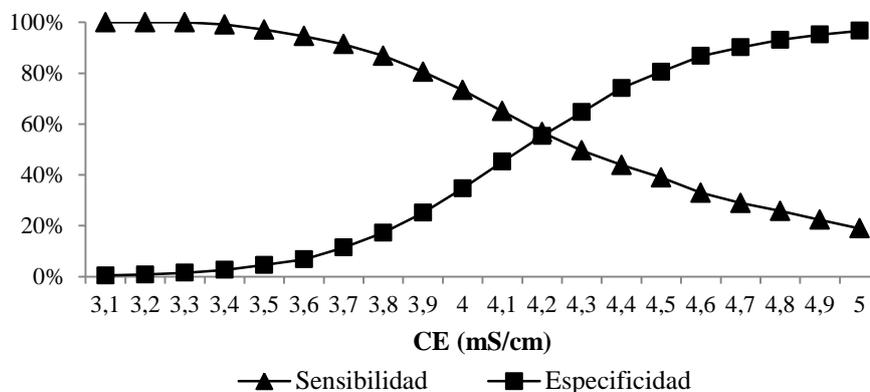
3.6. Detección de la infección intramamaria mediante umbrales absolutos de CE.

En las Figuras IV.5 y IV.6 se muestra la evolución de las curvas trazadas por la Sp, la Se, el VPP y el VPN al variar el umbral CE para la detección de glándulas infectadas al estudiar todos los datos en conjunto (Figuras IV.5a y IV.6a), en función del ordeño (Figuras IV.5b y IV.6b), o en función del número de parto de las ovejas (Figuras IV.5c y IV.6c).

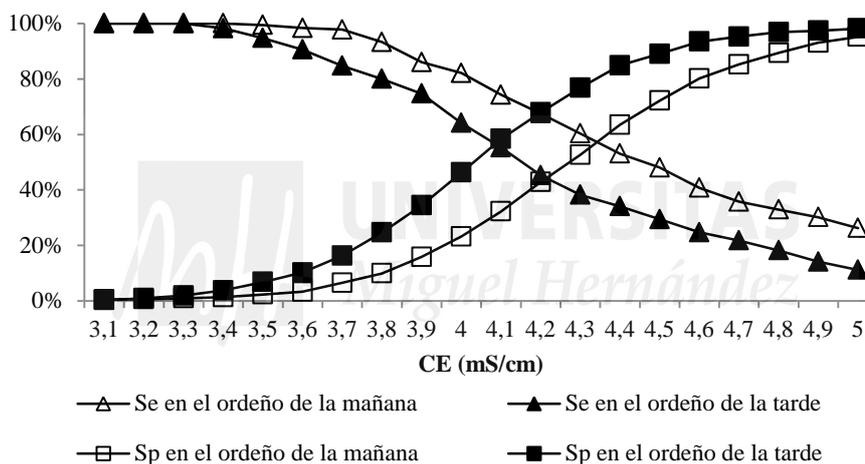
Al estudiar todos los datos en conjunto, el punto donde se cruzan la Sp y la Se se situó en 4,2 mS/cm (Figura IV.5a), variando ligeramente en función de la sesión de ordeño (4,3 mS/cm en el de la mañana y 4,1 mS/cm en el de la tarde, Figura IV.5b), o del número de lactación de las ovejas (4,2 mS/cm en multíparas y 4,3 mS/cm en primíparas, Figura IV.5c). De forma general, se obtuvieron unos valores moderados de Se y Sp, destacando sus variaciones en función del tipo de ordeño o número de parto de las ovejas para un mismo umbral de CE. Los valores más altos obtenidos en el punto de corte de ambas curvas se observaron en el caso de las ovejas de primer parto, con una Se del 63,64% y una Sp del 63,31% para un umbral de 4,3 mS/cm (Figura IV.5c). En todos los casos, se observó una disminución del número de falsos positivos (aumento del VPP) a medida que se incrementaba el umbral de CE, aumentando la Sp, pero también se produjo un incremento de falsos negativos, con lo que disminuyó la Se del método. Por otro lado, el valor predictivo positivo fue muy bajo, su valor máximo (67,39%) se registró en ovejas multíparas con un umbral de 5 mS/cm, en cambio en valor predictivo negativo en ningún caso fue inferior al 80% (Figuras IV.6a, IV.6b y IV.6c).

Figura IV.5. Sensibilidad y especificidad de la lectura de CE para la detección de mamitis (IV.5a), en función del ordeño (IV.5b) y del número de lactación (IV.5c).

IV.5a.



IV.5b.



IV.5c.

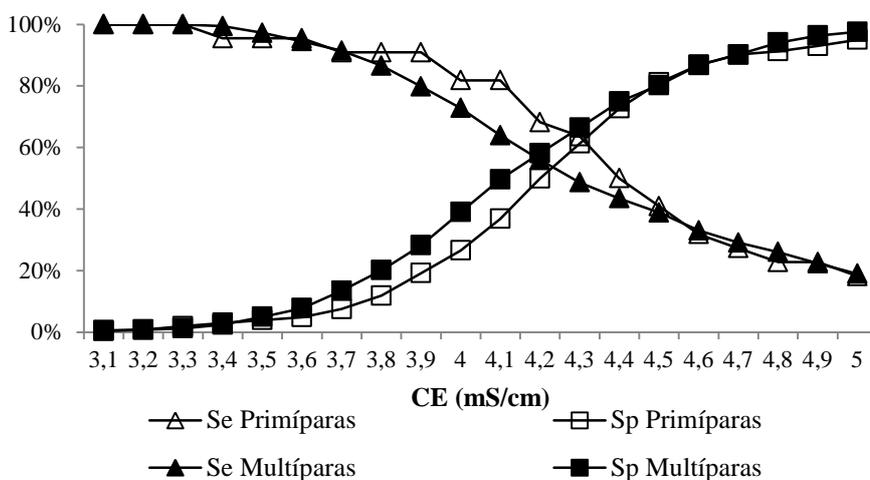
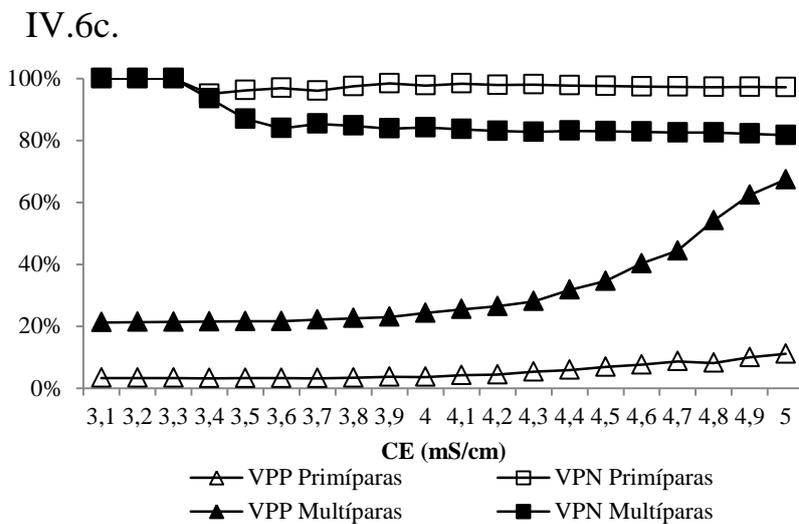
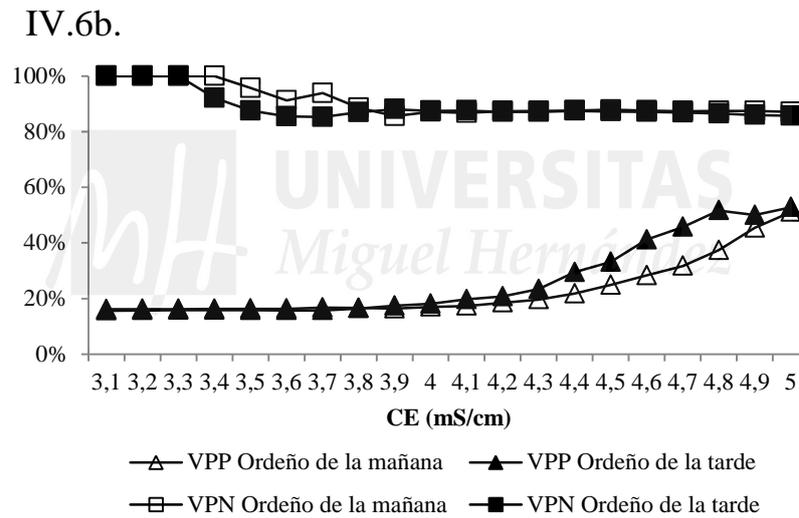
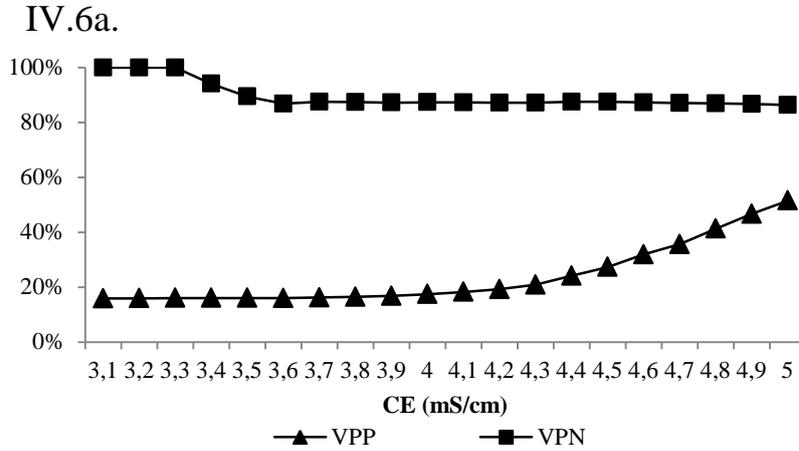


Figura IV.6. VPP y VPN de la lectura de CE para la detección de mamitis (IV.6a), en función del ordeño (IV.6b) y del número de lactación (IV.6c).



4. DISCUSIÓN.

Durante las dos lactaciones en las que se llevó a cabo el experimento, no se dio ningún caso de mamitis clínica. Esta prevalencia de casos clínicos coincide con los resultados de Contreras *et al.* (2007) quienes concluyeron que el porcentaje de mamitis clínicas en pequeños rumiantes era muy bajo (menor del 5%). La prevalencia de mamitis subclínica observada (8,64% y 17,28% al inicio y 23,08% y 16,67% al final del primer y del segundo año respectivamente) fue similar a los resultados obtenidos por Seegers *et al.* (1997) y Leitner *et al.* (2001), 10,4% y 39,9%, respectivamente. Todos los casos de glándulas con mamitis infecciosa o infección latente al inicio de la lactación se dieron en ovejas multíparas. De modo similar, Leitner *et al.* (2003) observaron un mayor porcentaje de glándulas sanas en animales de primer parto (70%) que en animales multíparas, encontrando el mínimo en las ovejas de tercera lactación (52%). La prevalencia de mamitis en un rebaño está relacionada con múltiples factores, al igual que su evolución a lo largo de la lactación. En este experimento, se observó un incremento de prevalencia en el primer año, mientras que en el segundo año el porcentaje elevado de autocuraciones causó un descenso de prevalencia al final de la lactación. Esto coincide con lo observado por McDougall *et al.* (2002), quienes registraron que el 93,8% de las ovejas infectadas se curaron espontáneamente. Sin embargo, Leitner *et al.* (2001) observaron que el estado sanitario de las glándulas permanecía estable durante toda la lactación en un 90% de los casos.

La mayoría de los patógenos aislados fueron estafilococos (97,4%), encontrándose bacterias Gram negativas solo en un pequeño porcentaje de casos (2,6%). Esto coincide con lo observado por diversos autores como Albenzio *et al.* 2002 y McDougall *et al.* (2002) quienes observaron que el 100% de las mamitis subclínicas fueron causadas por estafilococos. En cuanto a la reacción provocada por los patógenos aislados, Ariznabarreta *et al.* (2002) y Gonzalo *et al.* (2002), proponen clasificar los estafilococos causantes de mamitis atendiendo a si presentan o no sensibilidad a la novobiocina. De los patógenos aislados en este experimento, *S. aureus*, *S. caprae*, y *S. haemolytica* estarían en el grupo de patógenos sensibles al antibiótico, que según los autores que proponen esta clasificación pueden provocar grandes elevaciones del RCS. En este experimento, sí que se ha observado altos valores de CE y RCS cuando el patógeno era *S. aureus* (5,73 mS/cm y 15.601×10^3 cel/mL, respectivamente). En el caso de *S. caprae*, también se registra un alto

valor de RCS (1.337×10^3 cel/mL), pero no de CE (4,21 mS/cm). En contra de lo afirmado por Ariznabarreta *et al.* (2002) y Gonzalo *et al.* (2002) cuando la infección fue causada por *S. haemolytica*, se registró un RCS bajo (102×10^3 cel/mL). Por otro lado, estarían los estafilococos resistentes a la novobiocina, que según los autores presentan un bajo RCS, propio de patógenos menores, este es el caso de *S. xylosus* y *S. lentus*. Sin embargo, en este estudio, en las glándulas en las que se aisló *S. xylosus* se registró un elevado RCS y CE (2.989×10^3 cel/mL y 4,61 mS/cm).

La significativa mayor CE observada en las glándulas con mastitis infecciosa con respecto a las glándulas sanas (diferencia de 0,3 mS/cm en primíparas y 0,53 mS/cm en múltiparas) coincide con lo observado por Peris *et al.* (1991) en ganado ovino al comparar entre glándulas con CMT 0 y CMT +: 0,54 mS/cm de diferencia en la fracción de apurado, 0,21 en los primeros chorros y 0,27 mS/cm en leche máquina. En ganado vacuno, Kaşıkçı *et al.* (2012) también observaron diferencias significativas entre la CE de la leche de glándulas con CMT +, ++, o +++, al igual que Norberg *et al.* (2004), quienes midieron la CE de la leche glandular cada dos segundos durante el ordeño mediante el prototipo “Mastitis Detector” (S.A. Christensen, Kolding, Denmark), observando diferencias significativas de CE entre los distintos estados sanitarios de las glándulas (4,87, 5,37 y 6,44 mS/cm para glándulas sanas, con mastitis subclínica o mastitis clínica, respectivamente) En ganado caprino, Díaz *et al.* (2012) registraron un incremento de la CE en los cuatro días posteriores a la instauración de una infección intramamaria cuando ésta se produjo de forma bilateral.

En el caso de glándulas con infección latente solo se observaron diferencias significativas con respecto a las glándulas sanas en las ovejas primíparas, apreciándose que la CE fue mayor en las sanas. La CE de las glándulas infectadas fue superior a la de los otros dos estados sanitarios tanto en múltiparas como en primíparas. Este distinto comportamiento según el número de parto fue observado también en ganado caprino por Díaz *et al.* (2011) quienes obtuvieron un incremento significativo de la CE debida a la infección sólo en las glándulas de animales primíparas. En el mismo estudio, registraron mayor CE en cabras múltiparas que en primíparas de forma global, considerando solo las glándulas sanas o con mastitis bacteriana, mientras que no observaron diferencias entre número de parto al considerar solo las glándulas con mastitis inespecífica. Ying *et al.*

(2004) observaron distinto comportamiento de la CE en glándulas infectadas de caprino dependiendo de la raza; en cabras Saanen la CE aumentó en cabras infectadas, mientras en cabras de la raza Alpina registraron una disminución de la CE en las cabras infectadas. Al igual que con la CE, el RCS de las glándulas con mamitis infecciosa fue significativamente superior al de las glándulas sanas y con infección latente, tanto en ovejas primíparas como en multíparas. En este caso el RCS en mamitis latentes no disminuyó de forma significativa con respecto a las sanas en ovejas primíparas. Los RCS de las glándulas sanas y con mamitis latente registrados (de 61×10^3 cel/mL en primíparas con mamitis latente y de 99×10^3 cel/mL de multíparas sanas) son similares a los obtenidos por Peris *et al.* (1991) en ovejas Manchegas (80 , 72 y 130×10^3 cel/mL para CMT=0 en leche de primeros chorros, leche de máquina o leche de apurado, respectivamente), y a los obtenidos por Martins *et al.* (2013) en ovejas sanas Santa Inés ($167,1 \times 10^3$ cel/mL).

El RCS en las glándulas que presentaron mamitis infecciosa, se elevó de forma significativa tanto en animales de primer parto como en multíparas, siendo esta elevación más acusada en las ovejas multíparas. En ganado caprino, Díaz *et al.* (2011) observaron un efecto significativo del estado sanitario de las glándulas y del número de parto en el RCS, obteniendo mayor RCS en cabras multíparas que en primíparas, aunque la interacción de ambos factores (estado sanitario y número de parto) no fue significativa, contrariamente a lo observado en este experimento.

El RCS disminuyó a lo largo de la lactación, de acuerdo con los resultados de Gonzalo *et al.* (1994) en ganado ovino, quienes obtuvieron el valor mínimo de RCS a los 75 días del parto, mientras que Fuertes *et al.* (1998) registraron el valor mínimo a la quinta semana post-parto. En ambos trabajos, se registró un incremento del RCS a lo largo de la lactación, pero en el caso de Fuertes *et al.* (1998), este incremento fue muy leve y, por lo tanto, podría atribuirse a una mayor concentración de SCC por la disminución del volumen de leche, que a un empeoramiento del estado sanitario de las glándulas. En nuestro trabajo, sólo se observó un incremento del RCS al final de la lactación en ovejas multíparas y en glándulas con infección latente o mastitis infecciosa, por lo que puede atribuirse al empeoramiento del estado sanitario de las glándulas.

Independientemente del estado sanitario, la CE registrada en las ovejas multíparas (4,39 mS/cm) fue superior a las que se obtuvo en las ovejas primíparas (4,05 mS/cm). Estas diferencias se mantuvieron a lo largo de la lactación, de acuerdo con lo observado anteriormente por diversos autores en ganado vacuno (Holdaway *et al.*, 1996; Zecconi *et al.*, 2004), y que lo atribuyen a una mayor permeabilidad de la barrera sangre-leche en vacas multíparas causada por los daños producidos a lo largo de las distintas lactaciones.

El incremento de CE observado al final de la lactación, coincide con lo observado en caprino (Díaz *et al.* 2011) y vacuno (Holt, 1985), quienes lo atribuyeron a que a medida que avanza la lactación aumenta la permeabilidad de la barrera sangre-leche, provocando un incremento de la concentración de Na⁺ y Cl⁻ en leche. En ovejas Sardas, Caria *et al.* (2016) también obtuvieron un alto coeficiente de correlación entre la CE de la leche y su contenido en cloruros ($r = 0,893$).

La composición de la leche explicó una elevada proporción de la varianza de la CE ($R^2 = 0,69$), siendo el contenido graso el que tuvo una mayor influencia, seguido del contenido en Na⁺ y K⁺. Por el contrario, Díaz *et al.* (2011) en ganado caprino obtuvieron que el contenido en sales inorgánicas ejercía una influencia mayor sobre la CE de la leche que los macroconstituyentes de la leche (grasa, proteína y lactosa).

La correlación negativa obtenida de la CE con el contenido graso de la leche, está de acuerdo con Caria *et al.* (2016), Praentice (1962) y Muchetti *et al.* (1994), quienes afirmaron que los glóbulos de grasa, incrementan la distancia real en la migración de iones que tienden a cruzarse entre los dos electrodos del conductímetro. Albenzio *et al.* (2002), Leitner *et al.* (2004), Bianchi *et al.* (2004), Santos *et al.* (2007) observaron un descenso del contenido graso en leche de ovejas mamíticas, lo cual unido a un aumento de la concentración de iones explicaba el incremento de CE observado en la leche de las glándulas infectadas. Castillo *et al.* (2008), observaron que a medida que se acortaba el intervalo de ordeño aumentaba el contenido graso de la leche, por lo que la leche del ordeño de la tarde tiene un porcentaje graso mayor que la del ordeño de la mañana, esto unido a relación negativa obtenida del contenido graso con la CE, explica que la CE del ordeño de la tarde sea menor que la del ordeño de la mañana. La relación negativa entre el contenido en lactosa y la CE de la leche, está de acuerdo con lo publicado por Caria *et al.*

(2016) en ganado ovino y Hamann y Zeconni (1998). La lactosa es el componente lácteo más importante en la regulación de la presión osmótica de la leche, siendo su contenido, para una misma presión osmótica, inversamente proporcional a la concentración del Cl⁻. Así, el paso del ión cloruro al lumen alveolar desde el torrente sanguíneo, favorecido por el deterioro de las membranas de las células epiteliales de la glándula mamaria, es contrarrestado por una disminución de lactosa, mientras que al mismo tiempo, el deterioro de los lactocitos produce también un descenso de la síntesis de lactosa (Shuster *et al.*, 1991). De acuerdo con lo anterior, una infección intramamaria puede provocar un descenso de la cantidad de lactosa desde el 3% observado por Bianchi *et al.* (2004) y el 25% obtenido por Leitner *et al.* (2004).

Respecto a la correlación entre la CE y el RCS, al considerar todos los datos conjuntamente, se obtuvo una correlación positiva pero moderada ($r = 0,33$). McDougall *et al.* (2001) encontraron una correlación de $-0,37$ entre el RCS y la impedancia (inversa de la CE), afirmando que la impedancia no sería un buen indicador de mamitis en ganado ovino por los resultados obtenidos en dicho trabajo. Peris *et al.* (1991) observaron que la correlación entre la CE y el RCS fue significativa en los primeros chorros y en la leche de apurado (0,53 y 0,52 respectivamente), pero no en la fracción de leche de máquina. La correlación global encontrada por Díaz *et al.* (2011) en ganado caprino fue similar a lo observado en este trabajo (0,38), siendo significativa únicamente cuando los RCS eran bajos ($<500 \times 10^3$ cel/mL) o altos ($> 2000 \times 10^3$ cel/mL).

A pesar de que en el punto de corte (4,2 mS/cm) de la Se y la Sp no se obtuvieron altos valores (56,73% y 55,29%, respectivamente), se observó un alto VPN (87,16%), por lo que el uso de umbrales absolutos de CE para la detección de mamitis sería más preciso y fiable a la hora de descartar glándulas sanas que para detectar glándulas mamíticas. En el caso de glándulas en las que se produjera una alerta, sería necesario el uso de otros métodos para confirmar la enfermedad y así evitar un coste en innecesario en tratamientos sin estar la glándula realmente infectada. Peris *et al.* (1989), obtuvieron mejores resultados que los observados en este trabajo. Con un umbral de 5 mS/cm, lograron clasificar correctamente el 87,9% de las muestras, obteniendo una sensibilidad del 60,2% y una Sp del 91,4% también en ganado ovino. Pero también observaron que al tener en cuenta la diferencia de CE entre las dos glándulas del mismo animal los resultados mejoraban

considerablemente (70% de Se, 93% de Sp y 89,1% de muestras clasificadas correctamente para una diferencia entre glándulas superior a 0,3 mS/cm). Los resultados obtenidos por Caria *et al.* (2016) también son mejores que los obtenidos en este trabajo; obtuvieron una Se y Sp del 73,08 y el 75,46%, respectivamente, con un umbral de 4,84 mS/cm.

Estos resultados ponen de manifiesto que para el uso de la CE como método de detección de mamitis en ovino, al igual que apuntaban Díaz *et al.* (2011), se deberían desarrollar métodos de detección que no se vieran afectados por las variaciones que se producen en la CE de la leche debidas a factores intrínsecos del animal (número de parto, sesión de ordeño y estado de lactación) y no limitarse al establecimiento de umbrales absolutos.



IV. 2. EXPERIMENTO 2. EFECTO DE LA FRACCIÓN DE ORDEÑO EN LA CE DE LA LECHE DE OVEJAS MANCHEGAS.

1. INTRODUCCIÓN.

La principal ventaja que presenta la medida de la Conductividad Eléctrica (CE) como método de detección de mamitis es la facilidad con la que puede ser automatizada mediante la instalación de conductímetros en los tubos cortos de leche. Esto permite registrar y analizar datos de cada glándula a medida que son ordeñadas. Dependiendo del algoritmo utilizado, son comparados con datos anteriores de la misma glándula o animal, permitiendo una detección temprana de la enfermedad (Romero *et al.*, 2012). A causa de esto, la CE de la leche ha sido ampliamente estudiada en ganado vacuno y también, aunque en menor medida, en ganado caprino como método de detección de mamitis.

Hamann y Zecconi (1998) obtuvieron que el 60% de las variación de la CE en la leche de ganado vacuno, eran debidas a su contenido en cloro, sodio y potasio, resultado similar a los obtenidos por Díaz *et al.* (2011) en caprino. En ganado ovino, Romero *et al.* (2017) observaron que el contenido graso es el mayor responsable de las variaciones de CE en la leche, seguido del contenido en sodio y cloro. En los tres trabajos se observó que la CE de la leche no solo varía a causa del estado sanitario de las glándulas, sino que también se ve afectada por otros factores fisiológicos como el número de parto o el estado de lactación y la sesión de ordeño (mañana o tarde) en el caso de ganado ovino.

En ganado vacuno, se ha observado que la fracción de ordeño afecta a la CE de la leche y su capacidad para la detección de mamitis. Bansal *et al.* (2005) observaron que la CE disminuye a medida que avanza el ordeño, y aumenta la diferencia de CE entre glándulas sanas e mamíticas, concluyendo que los mejores resultados de detección de mamitis se obtendrían en la leche de apurado. Por el contrario, Bruckmaier *et al.* (2004b) y Lien *et al.* (2005) observaron que la mayor diferencia entre la CE de glándulas sanas e mamíticas se daba en los primeros chorros, afirmando que en esta fracción se detectaría mejor la enfermedad.

En pequeños rumiantes, los estudios acerca del efecto de la fracción de ordeño en la CE y su capacidad de detección de mamitis son escasos. Romero *et al.* (2012), observaron en ganado caprino que la CE disminuye a medida que avanza el ordeño tanto en glándulas

sanas como en las mamíticas, aunque esto no afectó a la capacidad de detección de mamitis, obteniendo la misma Se en las tres fracciones estudiadas.

En ganado ovino, la detección temprana de mamitis adquiere gran importancia debido a que la mayoría de la leche obtenida se destina a la producción de queso. Leitner *et al.* (2004abc) afirman que la producción de cuajada es menor en leche proveniente de glándulas mamíticas que en la de glándulas sanas, siendo mayor el tiempo necesario para su formación, resultados que están de acuerdo con los obtenidos por Bianchi *et al.* (2004). En esta especie, son escasos los trabajos acerca de los factores que afectan a la CE de la leche y su capacidad para la detección de mamitis. Peris *et al.* (1998), observaron que la mamitis provoca un incremento de la CE de la leche, proponiendo dos umbrales para la detección de mamitis. Un umbral absoluto de 5 mS/cm, con el que clasificaron correctamente el 87,9% de las muestras, y otro consistente en utilizar la diferencia de CE entre las dos glándulas, pudiendo clasificar correctamente el 89,1% de las muestras cuando esta diferencia era mayor de 0,3 mS/cm. Peris *et al.* (1991) estudiaron el efecto de la fracción de ordeño en la CE de la leche, observando una disminución significativa de la variable a medida que avanzaba el ordeño. También estudiaron la evolución del RCS así como la correlación entre el RCS y la CE en las tres fracciones de ordeño, obteniendo que el RCS aumentó a medida que avanzaba el ordeño, y una correlación significativa entre la CE y el RCS en los primeros chorros y en la leche de apurado.

Se ha observado que la fracción de ordeño tiene un efecto en la CE de la leche, pero es necesario conocer cómo afecta a su capacidad de detección de mamitis en ganado ovino, por lo que se planteó este experimento con el objetivo de estudiar el efecto de la fracción de ordeño en la CE y el RCS, así como su capacidad de detección de mamitis en función de la fracción de ordeño en la que se mida la variable.

2. MATERIALES Y MÉTODOS.

2.1. Lugar de realización y animales utilizados.

El experimento se realizó en la Granja Docente de Pequeños Ruminantes de la Escuela Politécnica Superior de Orihuela, perteneciente a la Universidad Miguel Hernández. El ritmo reproductivo fue de un parto anual, con destete de los corderos al nacimiento y alimentación de éstos mediante lactancia artificial. Tras el parto las ovejas pasaron a

ordeñarse dos veces al día (8:00 y 16:00h) en una sala de ordeño tipo Casse 1x12x12 con los siguientes parámetros de ordeño: 36 kPa de nivel de vacío, 180 pulsaciones por minuto y 50% de relación de pulsación.

La dieta, consistente en 2,5 kg diarios de mezcla “unifeed” y paja “ad libitum” se mantuvo constante a lo largo de la lactación.

2.2. Diseño experimental y variables estudiadas.

Con el fin de evitar variaciones en la CE debidas a factores ambientales, la toma de muestras se realizó en una sola sesión. Previamente a dicha toma de muestras y con el fin de conocer el estado sanitario de las glándulas mamarias, se realizaron tres controles con un intervalo semanal transcurridos dos meses del parto. En cada control se tomaron muestras para realizar un análisis bacteriológico de cada glándula y seguidamente para analizar el RCS de las glándulas de las 103 ovejas en lactación presentes en la explotación (86 multíparas y 17 primíparas). El segundo día de toma de muestras, además de las anteriores, se recogieron tres muestras de 100 mL de cada glándula de aquellas cuya producción era mayor de 500 mL (178 glándulas): primeros 100 mL, que fueron ordeñados a mano (F1); leche máquina, recogida utilizando medidores volumétricos durante el ordeño mecánico (F2); leche de apurado, recogida a mano tras el ordeño mecánico (F3).

2.3. Variables analizadas.

Para el análisis bacteriológico, inmediatamente después de la recogida aséptica de 5 mL de leche previamente al ordeño, se sembraron 20 μ L de leche en placas de Agar-sangre de oveja (Biomerieux, Lyon, Francia) que fueron incubadas a 37°C, realizándose un recuento del crecimiento bacteriano transcurridas 24, 48 y 72h desde la siembra. Para la clasificación entre cultivo positivo o negativo se tuvieron en cuenta las recomendaciones del National Mastitis Council (Harmon *et al.*, 1990). El cultivo se consideró positivo cuando al menos se observó un crecimiento de cinco colonias idénticas, y negativo si no había crecimiento transcurridas 72h de la siembra.

La CE (mS/cm) se midió en las tres fracciones inmediatamente después de su recogida con un conductímetro de laboratorio (GLP 32, Crison, Alella, España) con compensación automática de temperatura a 25°C. Tras la medida de la CE se separaron dos

alícuotas de 30 mL de cada una de las tres fracciones. A una de ellas se le añadió azidol para su conservación y posterior envío al Laboratorio Interprofesional de Leche de la Comunidad Valenciana, (España), donde se realizó el análisis del RCS ($\times 10^3$ cel/mL) mediante el método fluorométrico (Fossomatic 5000; Foss, Hillerød, Dinamarca). La otra alícuota se empleó para la determinación de la composición macroscópica ((grasa (G), caseína (Cas), proteína del suero (PS), lactosa (Lac) y cenizas (Cz)). El análisis se realizó mediante espectroscopía de infrarrojo (Milko Scan FT 120; Foss-electric, Hillerød, Dinamarca), expresando los resultados en porcentaje sobre la materia húmeda.

2.4. Definición del estado sanitario de las glándulas.

Las glándulas fueron clasificadas según el estado sanitario, en función de los resultados del análisis bacteriológico y el RCS. Las glándulas con análisis bacteriológico positivo o RCS superior a 400×10^3 cel/mL, se clasificaron como glándulas mamíticas. Las glándulas en las que el análisis bacteriológico fue negativo y el RCS inferior a 400×10^3 cel/mL se clasificaron como glándulas sanas.

2.5. Análisis estadístico

Con el fin de normalizar la distribución de los datos y poder aplicar los análisis estadísticos las variables CE y RCS se transformaron en el logaritmo base 10 (LCE, LRCS).

La relación de las variables dependientes LCE y LRCS con los efectos fijos estudiados se analizó mediante un Modelo Lineal Mixto (Proc Mixed, SAS V. 9.2, SAS Institute, 2012). Se consideraron los siguientes efectos fijos: el estado sanitario de las glándulas (INF_i , con 2 niveles: sanas o mamíticas), el número de parto de la oveja (NP_j , con 2 niveles: primíparas o multíparas), la fracción de ordeño (FRA_k , con tres niveles: primeros 100 mL, leche máquina o leche de apurado) y la interacción entre el estado sanitario de las glándulas y la fracción de ordeño. Las interacciones del número de parto con el estado sanitario o con la fracción de ordeño no fueron significativas, por lo que fueron eliminadas del modelo. Como efecto aleatorio se consideró la glándula (derecha o izquierda) anidada a la oveja para modelizar la covarianza entre las observaciones de las glándulas dentro de cada oveja (Barkema *et al*, 1997). Se utilizó un modelo de ajuste de la

correlación de la varianza entre medidas repetidas del mismo animal de tipo “Compound Simmetry”, al ser el que mejor ajuste presentó de acuerdo a los Aikake Iteration Criterion (AIC) y Bayesian Iteration Criterion (BIC).

Se analizó la correlación de la CE con el RCS (Proc Corr, SAS V.9.2. SAS Institute, 2012) de forma global y en cada una de las tres fracciones estudiadas. Se analizó la relación entre la composición de la leche (G, Cas, PS, Lac, Cz) y la CE (Proc Reg, SAS V.9.2. SAS Institute, 2012). Algunas muestras se dañaron durante su transporte al laboratorio para el análisis de la composición macroscópica de la leche, por lo que las glándulas de las que no se disponía de datos de composición en sus tres fracciones no se tuvieron en cuenta para el estudio de forma global de la relación de la CE con la composición de la leche.

Se calculó la evolución de la Se, Sp, VPP y VPN para la detección de mamitis en función de distintos umbrales de CE, para cada una de las tres fracciones de ordeño. Se definió la Se como el porcentaje de casos positivos que el método es capaz de detectar o la probabilidad de que una muestra positiva sea clasificada como tal (verdaderos positivos respecto de la suma de verdaderos positivos y falsos negativos). La Sp como el porcentaje de casos negativos que el método es capaz de detectar o la probabilidad de que una muestra negativa sea clasificada como tal (verdaderos negativos respecto a la suma de verdaderos negativos y falsos positivos). El VPP se definió como la probabilidad de que una glándula esté infectada cuando la muestra es clasificada como positiva (verdaderos positivos respecto a la suma de los verdaderos positivos y falsos positivos). Y por último, VPN se definió como la probabilidad de que una glándula no esté infectada cuando la muestra es clasificada como negativa (verdaderos negativos respecto a la suma de verdaderos negativos y falsos negativos).

3. **RESULTADOS.**

3.1. **Efecto de los factores considerados en la CE y el RCS en leche de ovejas de raza Manchega.**

En la Tabla IV.8 se muestran los resultados del análisis estadístico (valor F y nivel de significación) de los factores de variación en la CE y el RCS. Se observó un efecto significativo de la fracción de ordeño, el estado sanitario de las glándulas y el número de lactación de las ovejas en las dos variables estudiadas. En el caso de la CE, la fracción de ordeño causó un efecto más acusado que el estado sanitario de las glándulas o el número de lactación ($F = 19,95$, $15,88$ y $6,55$, respectivamente). En el RCS fue el estado sanitario de las glándulas el que provocó el efecto más acusado ($F = 112,02$), seguido de la fracción de ordeño ($F = 6,89$) y el número de lactación ($F = 5,28$). La interacción del estado sanitario con la fracción de ordeño sólo tuvo un efecto significativo en el RCS, mientras que en la CE no fue significativo.

Tabla IV.8. Resultado del análisis estadístico (valor F y nivel de significación) de las variables LCE y LRCS

EFEECTO	LCE (n = 534)	LRCS (n = 534)
Fracción	19.95***	6.89***
Estado sanitario	15.88***	112.02***
Número de lactación	6.55*	5.28*
Fracción x estado sanitario	1.98 ^{NS}	8.82***

LCE: logaritmo de la conductividad eléctrica. LRCS: logaritmo del recuento de células somáticas. * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$; NS: No significativo.
n = número de observaciones utilizadas en el modelo.

En la Tabla IV.9 se muestran las medias de CE y RCS según el estado sanitario de las glándulas y el número de parto. La CE de las glándulas mamíticas fue superior a la obtenida en las glándulas sanas ($4,64$ vs $3,82$ mS/cm). En cuanto a la fracción de ordeño (Tabla IV.10), el mayor valor de CE se registró en F1 ($4,27$ mS/cm), y disminuyó de forma significativa a medida que avanzaba el ordeño, siendo de $4,14$ y $4,06$ mS/cm en F2 y F3, respectivamente.

El RCS de las glándulas mamíticas (735×10^3 cel/mL) fue superior a las 96×10^3 cel/mL que se registraron en las glándulas sanas (Tabla IV.9), observándose un incremento a medida que progresaba el ordeño, contrariamente a lo que sucedía en la CE, obteniendo

el mayor valor (306×10^3 cel/mL) en F3, mientras que en F2 y F1 se registraron sólo 248×10^3 cel/mL (Tabla IV.10).

Tabla IV.9. Resultado de la comparación de medias de LCE y LRCS según el estado infectivo de las glándulas.

	LCE (Media ± ES) (Antilog, mS/cm) n = 534	LRCS (Media ± ES) (Antilog, $\times 10^3$ cel/mL) n = 534
Glándulas sanas	0,5936 ± 0,0063 (3,92)	1,9849 ± 0,0419 (96)
Glándulas mamíticas	0,6432 ± 0,0122 (4,39)	2,8663 ± 0,0814 (735)
N.S.	***	***

LCE: logaritmo de la conductividad eléctrica. LRCS: logaritmo del recuento de células somáticas. ES: Error estándar. N.S.: nivel de significación. (***) $P < 0.001$. n = Número de observaciones utilizadas en el modelo.

Tabla IV.10. Resultado de la comparación de medias de LCE y LRCS según la fracción de ordeño.

Fracción	LCE (Media ± ES) (Antilog, mS/cm) n = 534	LRCS (Media ± ES) (Antilog, $\times 10^3$ cel/mL) n = 534
Primeros chorros (F1)	0,6304 ^a ± 0,0077 (4,27)	2,3954 ^a ± 0,0522 (248)
Leche máquina (F2)	0,6169 ^b ± 0,077 (4,14)	2,3952 ^a ± 0,0522 (248)
Leche Apurado (F3)	0,6080 ^c ± 0,0077 (4,06)	2,4862 ^b ± 0,0522 (306)

LCE: logaritmo de conductividad eléctrica. LRCS: logaritmo del recuento de células somáticas. ES: Error estándar. a, b, c: Diferentes superíndices en una misma columna indican diferencias significativas a $P < 0,05$. n = Número de observaciones utilizadas en el modelo.

En las Tablas IV.11 y IV.12 se muestran las medias de LCE y LRCS en función del estado sanitario de las glándulas y la fracción de ordeño. La evolución de la CE a lo largo del ordeño al discriminar entre glándulas sanas e mamíticas fue similar a la observada al tratar todos los datos en conjunto, siendo la CE de las glándulas sanas (4,02, 3,94, 3,81 mS/cm para F1, F2 y F3 respectivamente) significativamente inferior a la CE registrada en las glándulas mamíticas (4,54, 4,34, 4,32 mS/cm para F1, F2 y F3 respectivamente) en las tres fracciones de ordeño. El RCS también fue significativamente mayor en las tres fracciones de las glándulas mamíticas que el registrado en las fracciones de las glándulas sanas. Respecto a la evolución a lo largo del ordeño, en las glándulas sanas se observó el

mismo comportamiento que al analizar todos los datos en conjunto, el RCS aumentó a medida que avanzaba el ordeño, siendo el RCS de la F3 significativamente superior al registrado en F1 y F2. Sin embargo, en las glándulas mamíticas no se observaron diferencias significativas entre las tres fracciones.

Tabla IV.11. LCE según el estado infectivo de las glándulas y la fracción estudiada.

	LCE (Media ± ES) (Antilog, mS/cm) n = 534		
	Glándulas sanas	Glándulas mamíticas	N.S.
Primeros chorros (F1)	0,6042 ^a ± 0,0065 (4,02)	0,6566 ^a ± 0,0127 (4,54)	***
Leche máquina (F2)	0,5961 ^b ± 0,0065 (3,94)	0,6376 ^b ± 0,0127 (4,34)	***
Leche Apurado (F3)	0,5806 ^c ± 0,0065 (3,81)	0,6354 ^b ± 0,0127 (4,32)	***

LCE: logaritmo de la conductividad eléctrica. ES: Error estándar. N.S.: nivel de significación de la comparación de medias en la misma fila. (***) $P < 0.001$. a, b, c: Diferentes superíndices en una misma columna indican diferencias significativas a $P < 0,05$.

Tabla IV.12. LRCS según el estado infectivo de las glándulas y la fracción estudiada.

	LRCS (Media ± ES) (Antilog, x10 ³ cel/mL) n = 534		
	Glándulas sanas	Glándulas mamíticas	N.S.
Primeros chorros (F1)	1,9044 ^a ± 0,0439 (80)	2,8864 ± 0,0868 (770)	***
Leche máquina (F2)	1,9393 ^a ± 0,0439 (87)	2,8511 ± 0,0868 (710)	***
Leche Apurado (F3)	2,1111 ^b ± 0,0439 (129)	2,8613 ± 0,0868 (727)	***

LRCS: logaritmo del recuento de células somáticas. ES: Error estándar. N.S.: nivel de significación de la comparación de medias en la misma fila. (***) $P < 0.001$. a, b, c: Diferentes superíndices en una misma columna indican diferencias significativas a $P < 0,05$.

3.2. Relación de la CE con la macro-composición de la leche.

En la Tabla IV.13 se muestran los resultados del análisis de regresión realizado para estudiar la relación de la CE con la composición de la leche y el contenido mineral. Se obtuvo un alto coeficiente de determinación tanto al estudiar los datos en conjunto ($R^2 = 0,89$) como al hacerlo en cada una de las tres fracciones de ordeño ($R^2 = 0,94, 0,94$ y $0,86$

para F1, F2 y F3, respectivamente). De forma global, el componente que explicó una mayor varianza de la CE fue la grasa, seguida de la proteína del suero y la lactosa, las tres variables mostraron una relación negativa con la CE. En las fracciones 2 y 3, también fue la grasa la que obtuvo un mayor R², seguida de la proteína del suero y la lactosa. En cambio, en la F1, las variaciones de la CE son producidas en mayor medida por la lactosa (R²_{parcial} = 0,61), quedando la grasa relegada a un segundo puesto, y el contenido en caseína en tercer lugar. En esta fracción la proteína del suero no mostró un efecto significativo en la variación de la CE, por lo que fue eliminada del modelo. El contenido en caseína solo mostró un efecto significativo en la variación de la CE en la leche de los primeros chorros, por lo que fue eliminada del modelo al analizar los datos en conjunto y en las fracciones 2 y 3.

Tabla IV.13. Relación entre la CE y la macro-composición de la leche.

	Variables	Parametro	Estadístico		Modelo	
			ES	R ² parcial		
Global	Intercepto	14,2502	0,2406		n	297
	Grasa (%)	-0,1846	0,0048	0,4495	R ²	0,8908
	Lactosa (%)	-0,1703	0,0400	0,3048	F-valor	780,35
	Proteína del suero (%)	-1,4056	0,7422	0,1365	P-valor	<0,0001
Primeros Chorros (F1)	Intercepto	12,5426	0,1726		n	137
	Lactosa (%)	-0,1637	0,0098	0,6066	R ²	0,9468
	Grasa (%)	-0,2825	0,0197	0,2582	F-valor	788,32
	Caseína (%)	-1,2962	0,0321	0,0802	P-valor	<0,0001
Leche máquina (F2)	Intercept	14,5675	0,3909		n	142
	Lactosa (%)	-1,7620	0,0613	0,7145	R ²	0,9423
	Grasa (%)	-0,1984	0,0092	0,1987	F-valor	750,96
	Proteína del suero (%)	-1,3229	0,1587	0,0291	P-valor	<0,0001
Leche Apurado (F3)	Intercept	14,2988	0,4421		n	129
	Grasa (%)	-1,4643	0,1394	0,3886	R ²	0,8630
	Lactosa (%)	-0,1658	0,0078	0,3535	F-valor	262,48
	Proteína del suero (%)	-1,7460	0,0753	0,1208	P-valor	<0,0001

ES: Error estándar. R²: Coeficiente de regresión. n = número de observaciones utilizadas en el modelo.

3.3. Correlación del RCS y la CE de la leche.

En la Tabla IV.14. se muestran los resultados del estudio de la correlación de la CE y el RCS de forma global y en cada una de las fracciones estudiadas. La correlación entre la CE y el RCS obtenida fue moderada y significativa en las tres fracciones de ordeño, obteniendo similares coeficientes de correlación. El mayor valor se registró en la F2 ($r = 0,495$), seguido de F1 ($r = 0,488$) y F3 ($r = 0,454$).

Tabla IV.14. Resultados del estudio de Correlación de la CE y el RCS.

Fracción	n	r	NS
Primeros chorros (F1)	178	0,48838	P<0,0001
Leche Máquina (F2)	178	0,49522	P<0,0001
Leche de apurado (F3)	178	0,45359	P<0,0001
Global	534	0,47290	P<0,0001

r: coeficiente de correlación. n: número de observaciones utilizadas en el modelo.
NS: Nivel de significación.

3.4. Detección de mamitis mediante umbrales absolutos de CE y RCS.

En las gráficas IV.7 y IV.8 se muestra la Se, Sp (Figura IV.7) y el VPP y el VPN (Figura IV.8) obtenidos al aplicar diversos umbrales de CE para la detección de mamitis en las tres fracciones estudiadas. Para todos los umbrales de CE ensayados, se obtuvo mejor Se, pero peor Sp en la F1, disminuyendo la Se y aumentando la Sp a medida que avanza el ordeño. En las tres fracciones de ordeño se observó un descenso de la Se y un incremento de la Sp al incrementar el valor del umbral de CE. El punto de corte entre la Se y la Sp varió en función de la fracción de ordeño (4,2, 4,1, y 4,0 mS/cm en la F1, F2 y F3, respectivamente). Los valores de Sp y Se obtenidos en los tres casos fueron moderados, destacando los obtenidos en la F3 (51,72% de Se y 54,36% de Sp con un umbral de 4,0 mS/cm). En el punto de corte entre Se y Sp en la F2 (umbral de 4,1 mS/cm) se obtuvo igual Se, pero la Sp fue menor (50,34%). En la F1 solo se obtuvo un 48,28% de Se y un 49,66% de Sp.

Se obtuvo un VPN superior al 80% en las tres fracciones de ordeño y en todos los umbrales de CE ensayados, pero el VPP solo fue superior al 20% a partir de un umbral de 4,5 mS/cm en F1, 4,4 mS/cm en F2, y 4,2 mS/cm en F3, alcanzándose los mayores valores en el umbral de 4,7 mS/cm en todas las fracciones, siendo la F3 la fracción que obtuvo el mayor VPP.

Figura IV.7. Se y Sp de la lectura de la CE para la detección de mamitis en función de la fracción de ordeño.

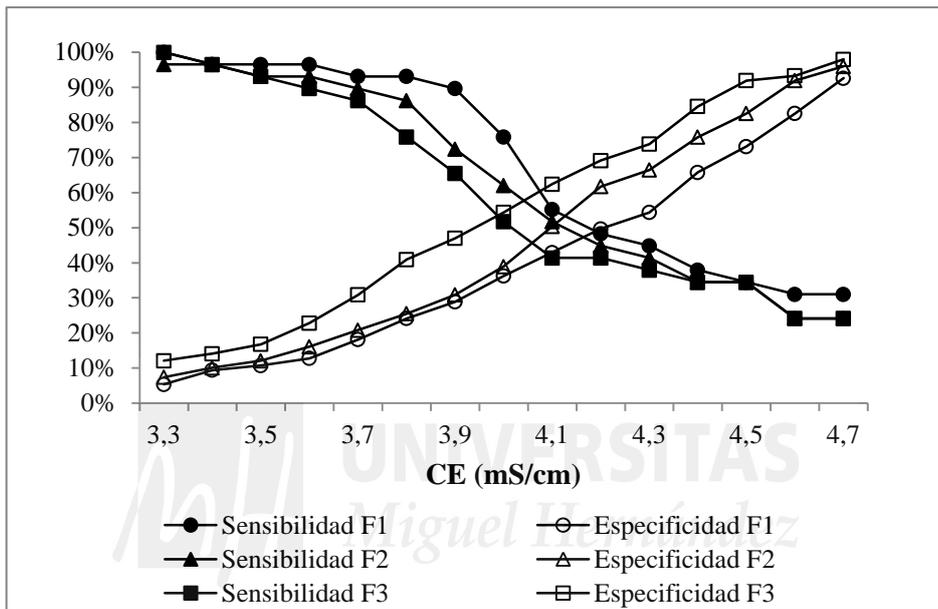
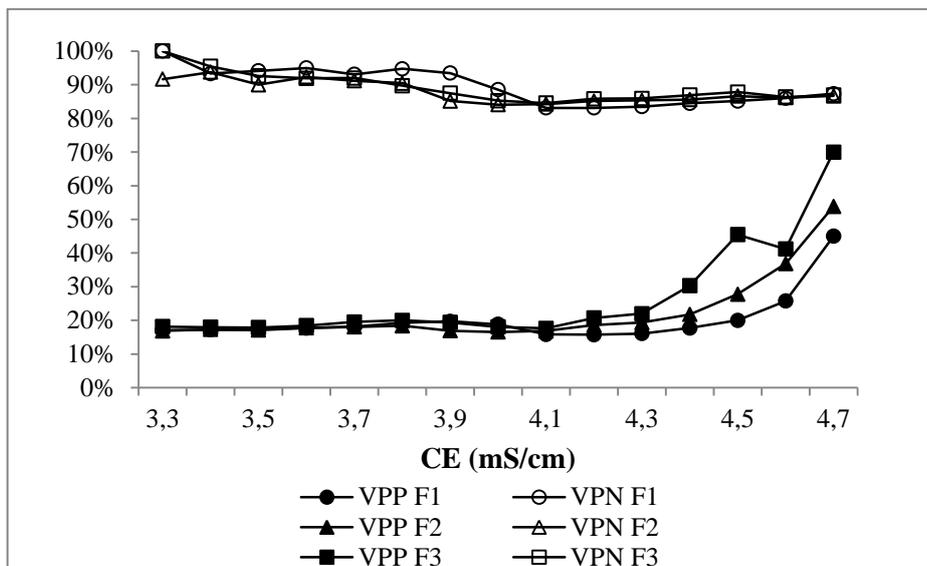


Figura IV.8. Valor Predictivo Positivo (VPP) y Valor Predictivo Negativo (VPN) de la lectura de la CE para la detección de mamitis en función de la fracción de ordeño.



En las gráficas IV.9 y IV.10 se muestra la Se, Sp (Figura IV.9) y el VPP y el VPN (Figura IV.10) obtenidos al aplicar diversos umbrales de RCS para la detección de mastitis en las tres fracciones estudiadas. No se observaron diferencias relevantes entre los valores de Se y Sp obtenidos en las tres fracciones para un mismo umbral. Al igual que en la CE, se observó un descenso de la Se y un incremento, aunque no tan acusado, de la Sp a medida que se incrementaba el umbral de RCS.

El punto de corte de la Se y la Sp se sitúa entre las 100 y las 200 x 10³ cel/mL en las tres fracciones de ordeño. Para un umbral de 100 x 10³ cel/mL, se obtuvieron valores muy altos de Se y Sp en las dos primeras fracciones (82,76 y 77,85% y 75,86 y 71,14% en F1 y F2, respectivamente). En la F3, la Se también fue muy elevada (72,41%) pero se obtuvo un valor moderado de Sp (49,66%). Para ese mismo umbral se registró un elevado VPN, pero el VPP fue muy bajo (42,11, 33,85 y 42,11% en F1, F2 y F3 respectivamente). Al establecer el umbral para la detección de mastitis en 200 x 10³ cel/mL disminuyó la Se en las tres fracciones, situándose en torno al 60%. La Sp, al igual que el VPP mejoró con respecto al umbral de 100 x 10³ cel/mL y el VPN siguió en torno al 90%. Al elevar el umbral a 400 x 10³ cel/mL, disminuyó la Se, pero mejoró el VPP del método (70,83%, 78,95% y 66,67% en F1, F2 y F3 respectivamente), mientras que la Sp, así como el VPN se mantuvo en torno al 90% en las tres fracciones de ordeño. Con este umbral, los mejores resultados se obtuvieron en la F1, con una Se del 58,62%, Sp del 95,30%, VPP del 70,83% y VPN del 92,21%.

Figura IV.9. Se y Sp del RCS para la detección de mastitis en función de la fracción de ordeño.

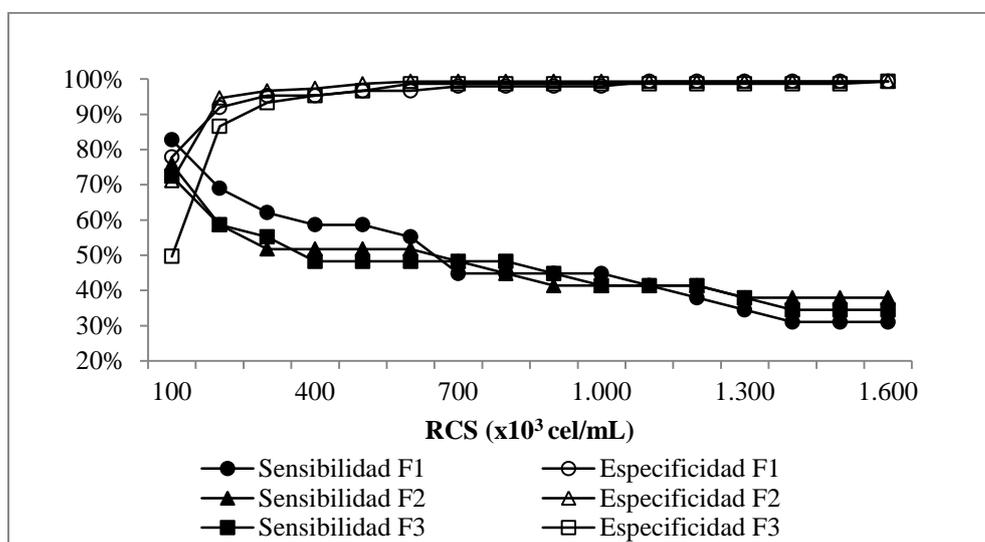
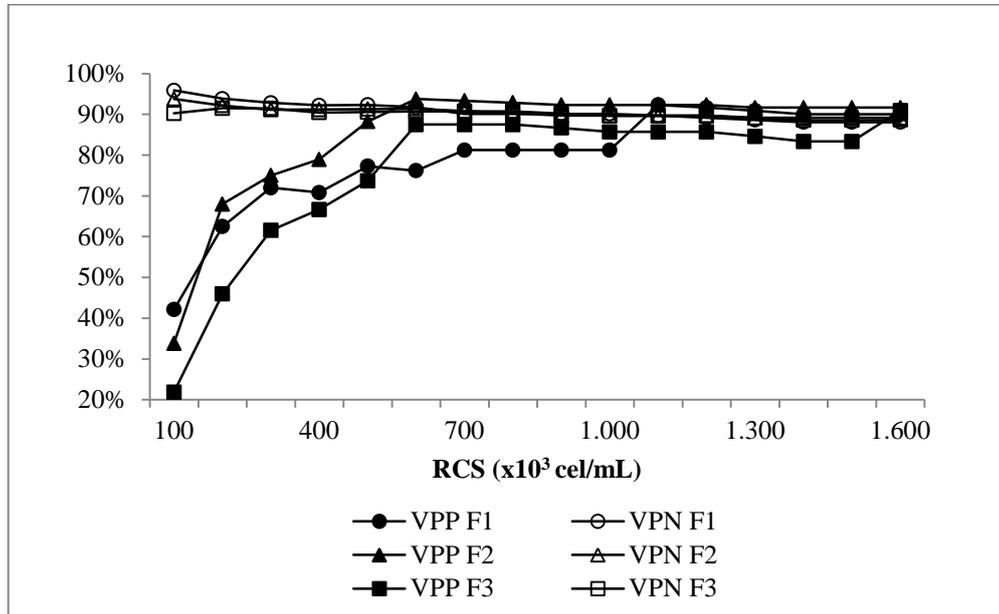


Figura IV.10. Valor Predictivo Positivo (VPP) y Valor Predictivo Negativo (VPN) del RCS para la detección de mastitis en función de la fracción de ordeño.



4. DISCUSIÓN.

Los valores obtenidos en las tres fracciones de ordeño, así como la evolución de la CE son similares a los obtenidos por Peris *et al.* (1991) en ganado ovino, quienes también obtuvieron que la CE medida en la F1 era significativamente superior a la de leche máquina y ésta a su vez significativamente mayor que la registrada en F3, esto también coincide con diversos estudios realizados en ganado vacuno (Bansal *et al.*, 2005; Bruckmaier *et al.*, 2004a; Lien *et al.*, 2005) y en caprino (Romero *et al.*, 2012). Al discriminar entre glándulas sanas e mamíticas, se observó el mismo comportamiento en los registros de CE en las glándulas sanas. En las glándulas mamíticas a pesar que también se obtuvo un descenso de la CE, no presentó diferencias significativas entre F2 y F3. La diferencia de CE entre glándulas sanas e mamíticas fue ligeramente superior en la F1 (0,52, 0,40, 0,41 mS/cm para F1, F2, F3 respectivamente), coincidiendo con los estudios realizados en ganado vacuno por Bruckmaier *et al.* (2004b) y Lien *et al.* (2005), quienes observaron que la mayor diferencia entre la CE de glándulas sanas e mamíticas se daba en los primeros chorros, afirmando que en esta fracción se detectaría mejor la enfermedad.

Por el contrario, Bansal *et al.* (2005) también en vacuno, afirmaron que sería mejor utilizar la leche de apurado que la de los primeros chorros para discriminar entre glándulas sanas e mamíticas debido a que al final del ordeño aumentaban las diferencias entre las variables estudiadas.

Una gran varianza de la CE ha sido explicada por variaciones en la composición de la leche ($R^2 = 0,89, 0,95, 0,94$ y $0,86$ de forma global y en F1, F2, y F3, respectivamente), siendo en F3 la grasa el componente que explica la mayor parte de esta varianza. Esto está de acuerdo con Prentice (1962) y Muchetti *et al.* (1994), quienes observaron que los glóbulos de grasa incrementan la distancia real en la migración de iones que tienden a cruzarse entre los dos electrodos del conductímetro. En ganado ovino McKusick *et al.* (2002) observaron que el contenido graso de la leche alveolar era significativamente superior al medido en la leche cisternal. Por otro lado, y de acuerdo con lo anterior, Nielsen *et al.* (2005) y Bansal *et al.* (2005) en ganado vacuno, observaron que el contenido graso de la leche tiende a aumentar durante el ordeño. Esto unido a que en F3 la mayor varianza de CE se debe al porcentaje de grasa en la leche, explicaría que la CE en dicha fracción sea inferior a la obtenida en las otras dos fracciones, de acuerdo con Peris *et al.* (1991), quienes afirmaron que la disminución de la CE en la F3 respecto a las otras dos fracciones de ordeño podría ser a causa de un incremento del contenido graso en dicha fracción.

La lactosa es la responsable de la mayor parte de la varianza de la CE en F1 y F2 ($R^2_{\text{parcial}} = 0,61$ y $0,71$, respectivamente), seguida de la grasa. En las tres fracciones se observó una relación negativa y significativa del contenido en lactosa y la CE de la leche, de acuerdo con lo registrado por Fernando *et al.* (1985) en ganado vacuno y Caria *et al.* (2016) en ovino. Según Hamann y Zeconni (1998), la lactosa es el componente lácteo más importante en la regulación de la presión osmótica de la leche. Para una misma presión osmótica, el contenido en lactosa es inversamente proporcional a la concentración del Cl⁻. El paso del ión cloruro al lumen alveolar desde el torrente sanguíneo se ve favorecido por el deterioro de las membranas de las células epiteliales de la glándula mamaria, siendo contrarrestado por una disminución de lactosa. Al mismo tiempo que el deterioro de los lactocitos produce también un descenso de la síntesis de lactosa (Shuster *et al.*, 1991). De acuerdo con lo anterior, una infección intramamaria puede provocar un descenso de la

cantidad de lactosa desde el 3% observado por Bianchi *et al.* (2004) hasta el 25% obtenido por Leitner *et al.* (2004). El incremento de la CE registrado en las tres fracciones de ordeño de glándulas mamíticas es debido a dos razones. Por una parte, se explica por la disminución de la síntesis de lactosa causada por el establecimiento de una infección intramamaria, y por otro lado, a causa de la disminución en la síntesis de grasa observado por Albenzio *et al.* (2002), Leitner *et al.* (2004), Bianchi *et al.* (2004) y Santos *et al.* (2007) en la leche de glándulas mamíticas de ganado ovino.

Por lo que respecta al RCS, el incremento que se registró en F3 respecto a F1 y F2 en las glándulas sanas concuerda con lo obtenido por Bansal *et al.* (2005) y Peris *et al.* (1991) en ganado ovino, quienes de forma general observaron que el RCS de la fracción de apurado fue significativamente superior al registrado en la leche máquina y en los primeros chorros. Sin embargo, en las glándulas mamíticas no se observaron diferencias significativas entre el RCS de las distintas fracciones, lo que explica que la interacción del estado sanitario con la fracción de ordeño fuera significativa. Los resultados obtenidos en las glándulas mamíticas contradicen los resultados obtenidos por Bansal *et al.* (2005) en ganado vacuno, y Romero *et al.* (2012) en caprino, quienes también obtuvieron mayor RCS en la fracción de apurado incluso en las glándulas mamíticas.

Los coeficientes de correlación entre la CE y el RCS obtenidos fueron significativos pero moderados tanto al estudiar los datos en conjunto ($r = 0,47$) como por separado ($r = 0,49, 0,50, \text{ y } 0,45$ para F1, F2 y F3 respectivamente). En todos los casos fueron superiores al registrado por Caria *et al.* (2016) en ovejas Sardas ($r = 0,31$). Peris *et al.* (1991) también obtuvieron correlaciones significativas entre la CE y el RCS, pero solo en F1 y F3 (0,53 y 0,52 respectivamente), en cambio en la fracción de leche de máquina la correlación obtenida no fue significativa. McDougall *et al.* (2001) encontraron una correlación de -0,37 entre el RCS y la impedancia (inversa de la CE), afirmando que la impedancia no sería un buen indicador de mamitis en ganado ovino por los resultados obtenidos en dicho trabajo.

Se observaron ligeras variaciones en cuanto a la Se y la Sp obtenidas en las tres fracciones para un mismo umbral de CE. La Se disminuyó a medida que incrementó el umbral de CE, observándose al mismo tiempo un incremento de la Sp. Esto es debido a

que con umbrales muy bajos, la mayoría de glándulas mamíticas serán clasificadas como tal, pero también se clasificarán como mamíticas muchas glándulas sanas, es decir, el porcentaje de falsos negativos será muy elevado (bajo VPP). Al igual que observaron Romero *et al.* (2017). El punto de corte de la curva trazada por la Se con la trazada con la Sp varió en función de la fracción de ordeño, produciéndose en 4,2 mS/cm en la F1 y 4,1 y 4,0 mS/cm en F2 y F3, respectivamente. Tanto la Se como la Sp obtenidas en este punto oscilaron en torno al 50% en los tres casos, siendo ligeramente más elevadas las registradas en F3, de acuerdo con lo observado por Bansal *et al.* (2005) en ganado vacuno. En cambio, Romero *et al.* (2012), en ganado caprino, no observaron diferencias entre la Se y Sp en las tres fracciones de ordeño independientemente del umbral de CE empleado.

El VPP obtenido fue inferior al 20% en las tres fracciones con umbrales inferiores a 4,3 mS/cm, con umbrales superiores, mejoró el VPP, pero cabe recordar que la Se para dichos umbrales fue inferior al 50%. El VPN fue en las tres fracciones y para todos los umbrales propuestos superior al 80%. Romero *et al.* (2017) también observaron que el VPN del método era superior al VPP, concluyendo que el uso de la CE para la detección de mamitis, sería más preciso a la hora de descartar glándulas sanas que detectar glándulas mamíticas. En las glándulas en las que se produjera una alerta, sería recomendable el uso de otros métodos para confirmar la enfermedad y evitar un coste innecesario en tratamientos.

Los resultados obtenidos por Peris *et al.* (1998) en ganado ovino fueron mejores que los obtenidos en este trabajo, siendo capaces de clasificar correctamente el 87,9% de las muestras, obteniendo una Se del 60,2% y una Sp del 91,4% al establecer un umbral de 5 mS/cm. Resultados que mejoraron al tener en cuenta la diferencia de CE entre las dos glándulas del mismo animal (70% de Se, 93% de Sp y 89,1% de muestras clasificadas correctamente para una diferencia entre glándulas superior a 0,3 mS/cm).

Los valores de Se, Sp, VPP y VPN también variaron ligeramente en función de la fracción al establecer umbrales absolutos de RCS para la detección de mamitis. Los mejores resultados se obtuvieron con bajos umbrales de RCS. Al incrementar el umbral, a pesar de mejorar el VPP del método, la Se disminuiría considerablemente, por lo que muchos casos no serían detectados. Si la finalidad del método es detectar el mayor número

de glándulas mamíticas, los mejores resultados se obtendrían con umbrales inferiores a de 500×10^3 cel/mL. Con umbrales superiores, disminuiría la capacidad de detección de glándulas mamíticas, pero si lo que se pretende es reducir los falsos positivos, aunque sea menos sensible, sería recomendable subir el umbral.

Los resultados obtenidos, corroboran estudios previos en ganado vacuno (Bruckmaier *et al.*, 2004a,b; Lien *et al.*, 2005; Bansal *et al.*, 2005), caprino (Romero *et al.*, 2012) y ovino (Peris *et al.*, 1991) que ponen de manifiesto las variaciones que se dan en la CE y el RCS en función de la fracción de ordeño, provocando una variación de la capacidad para detección de mamitis en función de la fracción de muestreo, a pesar de que en nuestro estudio esta variación no fue muy acusada.

IV. 3. CONCLUSIONES.

A partir de los resultados encontrados en los 2 experimentos incluidos en este ensayo se puede concluir que el estado de lactación, el número de parto, la sesión de ordeño (mañana o tarde), la fracción de leche ordeñada, la composición de la leche y el estado sanitario de la glándula mamaria tienen un efecto significativo en la CE de la leche

Concretamente y para cada uno de los factores estudiados se observó que:

- Las ovejas multíparas sanas presentaron una mayor CE que las primíparas sanas.
- Las glándulas con mamitis infecciosa, presentaron una CE significativamente mayor a la de las sanas o las que presentaron infección latente. Solo se dieron diferencias significativas en la CE entre glándulas sanas y con infección latente en las ovejas primíparas.
- La CE varió en función del estado de lactación de los animales, independientemente del estado sanitario de las glándulas o del número de lactación.
- La CE medida al inicio del ordeño fue superior a la leche máquina y esta a su vez a la de la leche de apurado en las glándulas sanas; en las mamíticas no hubo diferencias entre la CE de los primeros chorros y la leche máquina.
- Tanto la Se y la Sp como el VPP y el VPN para un mismo umbral de CE, variaron en función del ordeño (mañana o tarde), el número de parto de los animales o la fracción de leche estudiada.

Debido a ello, para desarrollar métodos de detección de mamitis en ovino utilizando la medida de la CE es necesario considerar todos los factores que han presentado un efecto significativo en la lectura de la CE. Una opción práctica a contemplar para minimizar estos factores consiste en el seguimiento individualizado diario de la CE de cada una de las glándulas, tal y como se ha constatado en otras especies como el vacuno y caprino y aplicar diferentes algoritmos que contemplen estos factores de variación. Para ello, es necesario realizar más estudios en los que se determine la evolución de la CE en los días posteriores a la instauración de la infección intramamaria en la glándula mamaria, y se desarrollen métodos fiables de lectura de la CE “on-line” durante el ordeño que optimicen los resultados de Se y Sp en la detección de mamitis.



**V. EFECTO DEL ESTABLECIMIENTO DE
LA INFECCIÓN INTRAMAMARIA EN
LA CONDUCTIVIDAD ELÉCTRICA DE
LA LECHE DE OVEJA DE RAZA
MANCHEGA Y ESTUDIO DE VARIOS
ALGORITMOS PARA SU DETECCIÓN
ON-LINE.**

V. EFECTO DEL ESTABLECIMIENTO DE LA INFECCIÓN INTRAMAMARIA EN LA CONDUCTIVIDAD ELÉCTRICA DE LA LECHE DE OVEJA DE RAZA MANCHEGA Y ESTUDIO DE VARIOS ALGORITMOS PARA SU DETECCIÓN ON-LINE.

1. INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS.

La mastitis en ovino lechero, tanto clínica como subclínica, produce pérdidas económicas debido a la disminución de la producción y del rendimiento quesero (Leitner *et al.*, 2008). A todo esto, hay que sumar los gastos producidos por el coste de los tratamientos, las pérdidas por los periodos de retirada de leche tras la aplicación de dichos tratamientos e incluso en algunos casos la mastitis produce la muerte del animal, o pérdida completa de una o varias glándulas.

La importancia de la mastitis subclínica radica en su dificultad para ser detectada por el ganadero, por lo que éste no puede tomar medidas al respecto. Leitner *et al.* (2008) afirman que en un rebaño con un 75% de glándulas infectadas, se puede alcanzar una disminución de la producción del 12,2% en ganado ovino, mientras que en ganado caprino, con el mismo porcentaje de glándulas infectadas, las pérdidas pueden ser del 2,3%. La mastitis también provoca una alteración de la composición de la leche y su consecuente disminución del rendimiento quesero, más acusado en ovino que en ganado vacuno o caprino (Leitner *et al.*, 2011). Otro problema unido a la mastitis subclínica es que, al no ser detectada, no se aplica ningún tratamiento a los animales infectados, por lo que la enfermedad suele persistir en lactaciones posteriores (Gonzalo *et al.*, 2004). Debido a ello, en ganado ovino es de gran importancia el desarrollo de técnicas que permitan una detección temprana y eficaz de los casos de mastitis, que ayuden a minimizar las pérdidas económicas que conlleva dicha enfermedad.

La principal ventaja que presenta la medida de la Conductividad Eléctrica (CE) como método de detección de mastitis es la facilidad con la que puede ser automatizada mediante la instalación de sensores de CE en los tubos cortos de leche. Esto permite registrar y analizar datos de cada glándula a medida que son ordeñadas. Como ya se vió en el Ensayo 1 de esta Tesis, en ganado ovino Manchego hay diversos factores no infecciosos que afectan a la CE, por lo que el establecimiento de umbrales absolutos de CE para la

detección de mamitis no alcanza unos resultados de sensibilidad o especificidad deseables. Este aspecto también se ha visto en cabras Murciano-Granadinas (Díaz *et al.*, 2011).

Para mejorar la detección de mamitis utilizando la medición de la CE en la leche, en ganado vacuno se desarrollaron algoritmos de cálculo capaces de obtener una Sp del 95% y Se del 96 y del 100% para mamitis clínicas y subclínicas, respectivamente, con un intervalo de confianza del 95%, empleando el método de la señal de búsqueda (*Tracking Signal Method*, De Mol *et al.*, 1999). Entre la bibliografía consultada, el algoritmo más empleado es el basado en la comparación del valor de la CE del ordeño actual con la media móvil de los últimos ordeños, fijando un incremento a partir del cual se dé la señal de alarma. Con este método, Mele *et al.* (2001) utilizando los datos de los últimos 14 ordeños obtuvieron una Se del 87 y 89% para mamitis clínica y subclínica respectivamente y una Sp del 88%, pero en el cálculo de la Sp solo tuvieron en cuenta datos de animales que permanecieron sanos durante todo el experimento.

En pequeños rumiantes, aunque en menor medida, también se ha estudiado el empleo de algoritmos que incluyen la CE para la detección de mamitis. Díaz *et al.* (2012) observaron que durante los días inmediatamente posteriores a la instauración de la infección intramamaria en ganado caprino se producía una elevación significativa de la CE, que variaba de magnitud según el patógeno causal. En un trabajo posterior, Romero *et al.* (2014) estudiaron en caprino el empleo de algoritmos que comparaban la medida diaria e individual de la CE de la leche glandular con su media móvil, siendo capaces de clasificar todos los casos de mamitis clínica, aunque obtuvieron diferentes resultados en los casos subclínicos, en función del algoritmo. La mayor Se (58,3%) la obtuvieron al considerar como positivos aquellos casos en los que la CE del día en cuestión se desviaba al menos tres veces la desviación típica de su media móvil (calculada con los valores de los cuatro días previos). Zaninelli *et al.* (2015), en un trabajo en el que incluyeron unos sensores de CE en pezoneras comerciales, con lo que podían medir la CE por glándula “online”, fueron capaces de obtener una Se del 80% aunque una Sp entre el 25 y el 42,9%, dependiendo del algoritmo de cálculo utilizado para la detección de mamitis en cabras de raza Saanen. El mismo grupo, en un trabajo anterior utilizando el modelo “Fuzzy Logic” habían obtenido resultados superiores: Se del 81% con una Sp del 69% (Zaninelli *et al.*, 2014).

En ganado ovino los estudios son muy escasos. Peris *et al.* (1989) observaron que la mamitis provoca un incremento de la CE de la leche y propusieron dos umbrales para la

detección de mamitis. Uno de ellos de 5 mS/cm para diagnosticar las glándulas con mamitis, logrando una Se del 60,2% y una Sp del 91,4%, con un 87,9% de las muestras clasificadas correctamente. El otro umbral consistía en utilizar una diferencia de CE entre las dos glándulas del mismo animal de 0,3 mS/cm, encontrando mejores resultados (70% de Se, 93% de Sp y 89,1% de muestras clasificadas correctamente). McDougall *et al.* (2002) no encontraron diferencias significativas entre la impedancia (propiedad inversa de la CE) de glándulas sanas e infectadas, aunque sí obtuvieron una correlación negativa, pero de bajo valor, entre la impedancia y el RCS ($r = -0,27$). En estudios más recientes, Caria *et al.* (2016) a partir de la CE medida en muestras obtenidas a nivel de glándula en ovejas Sardas y utilizando un análisis ROC ("Receiver Operation Characterstic") eligieron como umbral de discriminación una CE de 4,835 mS/cm, con el que los valores de Se, Sp y área bajo la curva fueron 73,08%, 75,46% y 0,804% respectivamente. Seguidamente testaron un prototipo desarrollado para la medida en tiempo real de la CE, con el que, utilizando ese umbral, fueron capaces de clasificar correctamente el 64,7% de las muestras que presentaron RCS > 700.000 cel/mL y el 76,5% de muestras con bajo RCS (< 700.000 cel/mL), destacando los autores el bajo porcentaje de falsos negativos obtenido (8,8%).

Con el fin de conocer el efecto de la instauración de la infección intramamaria en la CE de la leche de oveja Manchega, se planteó este ensayo con dos objetivos. Estudiar el efecto de la instauración de la infección intramamaria en la CE de la leche glandular y su evolución en el tiempo siguiente a la infección. Y evaluar la capacidad de detección de mamitis de diversos algoritmos basados en la medida diaria de la CE de la leche glandular utilizando un conductímetro de laboratorio y un prototipo diseñado para la lectura automática diaria de la CE de la leche a nivel de glándula mamaria durante el ordeño mecánico.

2. MATERIALES Y MÉTODOS.

2.1. Lugar de realización y animales utilizados.

El experimento se realizó en la Granja Docente de Pequeños Rumiantes de la Escuela Politécnica Superior de Orihuela, perteneciente a la Universidad Miguel Hernández. El ritmo reproductivo fue de un parto anual, con cubrición en octubre-noviembre y partos programados para mediados de abril. Las ovejas amamantaron a los corderos hasta su destete, y la leche no consumida por los corderos se ordeñaba una vez al día para evitar un descenso de la producción. El destete se realizó al cumplir los corderos el mes de vida y las ovejas pasaron a ordeñarse dos veces al día (8:00 h y 16:00 h) en una sala de ordeño tipo Casse 1x12x12 en línea baja, con los siguientes parámetros de ordeño: 36 kPa de nivel de vacío, 180 pulsaciones por minuto y 50% de relación de pulsación. Las glándulas se ordeñaban por separado, y en el tubo corto de leche se instaló el prototipo para la medición de la CE “on-line” descrito en Materiales y Métodos.

La alimentación de las ovejas, consistente en 2,5 kg diarios/oveja de mezcla completa (*unifed*) especial para ovejas de alta producción lechera, se administró repartida en dos tomas, y se mantuvo constante a lo largo de todo el experimento. Los animales también disponían de bloques vitamínico-minerales así como de paja de cereal *ad libitum*. El agua era suministrada a voluntad en bebederos de cazoleta con boya de nivel constante.

2.2. Diseño experimental y variables estudiadas.

El experimento tuvo una duración de 7 semanas: una semana de periodo pre-experimental, empleado para seleccionar los animales y 6 semanas de periodo experimental.

Selección de animales. Tras el destete de los corderos (un mes después del parto) se inició el periodo pre-experimental en el que se realizaron dos controles con un intervalo entre ambos de seis días a las 50 ovejas en lactación presentes en la explotación. En estos controles se tomaron 5 mL de leche de cada glándula de forma aséptica antes del ordeño de la mañana, que se utilizaron para el análisis bacteriológico. Posteriormente, las glándulas de cada oveja se ordeñaron por separado recogiendo la leche en medidores volumétricos de

donde se extrajo una muestra representativa de 100 mL tras anotar la producción. Esta muestra se utilizó para analizar el RCS y la CE.

Con la información obtenida en este periodo, se seleccionaron 26 animales (15 ovejas que producían menos de 400 mL/glándula y 11 de más de 400 mL/glándula) libres de infección intramamaria que se utilizaron en el periodo experimental.

Periodo experimental. El Periodo Experimental se inició tres días después del segundo control Pre-experimental y tuvo una duración de 6 semanas divididas en dos fases. En la primera fase del Periodo Experimental (dos semanas), con el fin de establecer unas condiciones previas a la instauración de la infección, se midió diariamente la producción y la CE de ambas glándulas de cada animal en ambos ordeños (mañana y tarde). Después de esta primera fase, los animales se sometieron a una serie de situaciones desfavorables para su salud (SDS) que pueden darse en explotaciones comerciales y que aumentan la exposición a la entrada de patógenos a través de los pezones durante el ordeño. Estas situaciones desfavorables fueron:

a) Ordeñar consecutivamente una oveja sana después de otra con infección intramamaria, habiendo disminuido el diámetro de los tubos cortos de leche (con lo que se disminuye el volumen de evacuación) y taponar los orificios de las pezoneras, lo que favorece la inmersión del pezón en leche y la consiguiente infección, al mismo tiempo que se provocaban fluctuaciones cruzadas permitiendo entradas bruscas de aire por una pezonera;

b) Elevar el nivel de vacío (NV) en el ordeño a 40 kPa;

c) Sobreordeño de 3 minutos;

d) Y por último, la eliminación del sellado de pezones con yodo tras el ordeño.

Las glándulas fueron sometidas a SDS hasta que se obtuvo un número suficiente de casos de glándulas infectadas (Tabla V.1.). Tras finalizar las SDS, el experimento se alargó durante cuatro semanas más para poder observar la evolución de las variables estudiadas tras el establecimiento de la infección intramamaria.

Definición del estado sanitario de las glándulas. Las glándulas fueron clasificadas según el estado sanitario, en función de los resultados del análisis bacteriológico (realizado según la metodología descrita en Materiales y Métodos Generales) y el RCS.

La clasificación entre cultivo bacteriológico positivo o negativo se realizó teniendo en cuenta las recomendaciones del National Mastitis Council (Harmon *et al.* 1990); se consideró que el cultivo era positivo al observarse un crecimiento de al menos cinco unidades formadoras de colonia (u.f.c.) en el área de siembra, y negativo si no había crecimiento transcurridas 72 h de la siembra. Se clasificaron como cultivos mixtos cuando se observaron dos microorganismos de morfología colonial diferente (más de cinco u.f.c./área de siembra) y su distribución fue equitativa desde la zona de inoculación inicial y a lo largo del área de siembra, sugiriendo la implicación de ambos en la infección de la glándula. Si el crecimiento fue de tres o más colonias distintas, el cultivo se clasificó como contaminado.

En las muestras que resultaron positivas se aislaron los microorganismos y fueron congelados en leche con glicerol al 2% a -4°C hasta la finalización de los experimentos, momento en el que se realizó la identificación del género bacteriano. Esta identificación se efectuó mediante la tinción de Gram y la prueba de catalasa en aquellas colonias de morfología compatible con microorganismos Gram positivos. Por último, en el caso de los estafilococos se realizó la identificación de la especie bacteriana mediante el empleo del kit Apistah (Bio Merieux, Francia), mientras que los compatibles con enterobacterias se identificaron mediante el kit BBL Enterotube II, BD Diagnostic Systems (Alemania).

Las glándulas con análisis bacteriológico positivo y RCS superior a 400×10^3 cel/mL, se clasificaron como glándulas mamíticas. Las glándulas en las que el análisis bacteriológico fue negativo y el RCS inferior a 400×10^3 cél/mL se clasificaron como glándulas sanas. No se dieron casos en los que el análisis bacteriológico fuera positivo sin ir acompañado de una elevación del RCS ni elevaciones del RCS con análisis bacteriológicos negativos.

Variables analizadas. El análisis bacteriológico se realizó con diferente frecuencia, según la fase del experimento. Se realizaron tres cultivos bacteriológicos 14, 7, y 3 días antes de someter a las glándulas a SDS y el mismo día del inicio de las SDS antes del ordeño matutino. Posteriormente se realizaron cultivos diariamente para la confirmación del estado sanitario de las glándulas y el día del establecimiento de la infección. Una vez confirmada la instauración de la infección el experimento se prolongó 4 semanas más, realizándose 6 cultivos a los 4, 7, 11, 14, 21, y 28 días de la instauración de la infección, para confirmar la presencia y/o la persistencia de la infección.

La producción de leche se determinó diariamente en el ordeño de la mañana y de la tarde mediante medidores volumétricos, obteniéndose de ellos una muestra representativa del total ordeñado (100 mL) que se empleó para la determinación de la CE y el resto de variables, en la frecuencia establecida para cada una.

El RCS ($\times 10^3$ cel/mL) se analizó en el Laboratorio Interprofesional de Leche de la Comunidad Valenciana mediante el método fluoro-opto-electrónico (Fossomatic 5000; Foss, Hillerød, Dinamarca) en muestras a las que se había adicionado azidol. Se determinó en leche de los dos ordeños de los días 14 y 7 previo a someter a las glándulas a SDS, de forma diaria desde tres días antes hasta transcurridos 14 días desde las SDS, y se realizaron 4 controles más a los 18, 21, y 28 días tras las SDS.

La composición macroscópica (Grasa, Caseínas, Proteínas del Suero, Lactosa y Cenizas) y el contenido mineral (Na^+ , K^+ , Cl^-) fueron analizados en muestras de leche tomadas en los dos ordeños de los días 14, 7 y 3 antes de las SDS, el día de inicio de las SDS y transcurridos 4, 7, 11, 14, 18, 21 y 28 días de la instauración de la infección. La composición macroscópica se analizó mediante espectroscopía de infrarrojo (Milko Scan FT 120; Foss-electric, Hillerød, Dinamarca), expresando los resultados en porcentaje sobre la materia húmeda. El contenido en Na^+ y K^+ (mg/L) se determinó mediante fotometría de llama, (PFP, JENWAY, Staffordshire, Reino Unido). Para la determinación del contenido de Cl^- (mg/L) se utilizó el método de Mohr adaptado para leche (AOAC, 1995), realizando los análisis siempre la misma persona para evitar el efecto del operario. Las muestras fueron conservadas mediante congelación (-18°C) hasta el momento de su análisis.

La CE (mS/cm) se analizó diariamente en el ordeño de la mañana y en el de la tarde mediante un conductímetro de laboratorio (GLP 32, Crison, Alella, España) con compensación automática de temperatura a 25°C y mediante el prototipo de conductímetro diseñado para la medición on-line durante el ordeño.

Para la medida automática de la conductividad eléctrica se utilizó un prototipo intercalado en el tubo corto de leche desarrollado en conjunto por investigadores del grupo de investigación “Genética, Bienestar, Calidad y Seguridad Alimentaria en Producción Animal” del Departamento de Tecnología Agroalimentaria e investigadores del Departamento de Ingeniería de Sistemas Industriales, área de Ingeniería de Sistemas y Automatismos de la Universidad Miguel Hernández.

A medida que la leche era ordeñada, fluía a través del prototipo y se registraba su CE “on-line” (ver Figura III.8 de Materiales y Métodos generales), para finalmente llegar

la leche al medidor volumétrico (del que se tomaba la muestra utilizada para medir el resto de variables). El prototipo constaba de un conductímetro comercial (modelo GLP31, Crison Instruments, Alella, España) con sonda de CE conductiva de anillos de platino (Modelo 52-93, Crison Instruments, Alella, España) y sonda de temperatura integrada tipo PT1000, con un rango de medición de CE de 2 a 199,9 mS/cm y coeficiente de compensación de temperatura del 2%/°C. La temperatura de compensación era de 25 °C. La sonda se ubicó en el interior de un habitáculo fabricado en cianocrilato y metacrilato, en el que se alojó la sonda de medición. El habitáculo donde se ubicaba la sonda estaba provisto de tres orificios cuyas funciones eran:

- Permitir la entrada de la leche recogida por el tubo corto al mismo tiempo que era ordeñada.
- Permitir la evacuación de la leche (o su acumulación si se cerraba la válvula con la que estaba provisto).
- Permitir la transmisión de vacío hasta las pezoneras y la extracción de la leche cuando se cerraba la válvula para acumular ésta en el interior del habitáculo.

Para realizar las medidas de CE se cerraba la válvula manual de la cámara de llenado hasta que ésta estaba completamente llena. A continuación se abría la válvula para permitir la evacuación de la leche, cerrándola seguidamente para provocar de nuevo el llenado de la cámara, repitiendo esta rutina hasta el final del ordeño de la glándula.

El conductímetro recogía una medida de CE por segundo. Los datos recogidos se volcaban a un ordenador conectado a la sonda de medición donde eran almacenados por el software proporcionado por la empresa fabricante (*Crison Instruments*, España) en archivos de texto por separado según el día de toma de muestras, glándula ordeñada y tipo de ordeño (mañana o tarde). Estos datos se transformaron a datos numéricos con el empleo de la hoja de Cálculo Excel (*Microsoft Office*, 2013) y finalmente se procesaron con el *software* informático MATLAB para obtener a partir de ellos un valor diario para cada glándula y ordeño. Éste valor único se obtuvo como la media de los máximos locales de cada ordeño, siendo los máximos locales los valores de CE máxima registrados en cada llenado de la cámara de medición a lo largo del ordeño de cada glándula, valor que se corresponde con el momento de llenado máximo de la cámara.

2.3. Análisis estadístico.

Efecto de la instauración de la infección intramamaria sobre las variables.

Para conocer la evolución de la CE, el RCS y la producción de las glándulas en función del estado sanitario de las glándulas (INF) a lo largo de los periodos temporales cercanos a la instauración de la infección (PER), las variables CE y RCS fueron transformadas en el logaritmo base 10 (LCE, LRCS) con el fin de normalizar la distribución de los datos. La comparación de medias se realizó mediante un Modelo Lineal Mixto (Proc Mixed, SAS V. 9.2, SAS Institute, 2012). Se consideraron los siguientes efectos fijos: el estado sanitario de las glándulas (INF_i, con cuatro niveles; 0: Ambas glándulas colaterales de animales permanecieron libres de infección todo el experimento; 1: Glándula sana durante el experimento cuya colateral se infectó a lo largo el experimento; 2: Glándula infectada cuya colateral permaneció libre de infección durante todo el experimento; 3: Ambas glándulas colaterales de animales infectados bilateralmente durante el experimento.); la sesión de ordeño (ORD_j, con dos niveles: ordeño de la mañana o de la tarde); el periodo temporal respecto al momento de la instauración de la infección (PER_k, con siete niveles; k=1: Desde 9 hasta 7 días antes de infección, k=2: Desde 6 hasta 4 días antes de infección, k=3: Desde 3 hasta 1 días antes de infección, k=4: Desde 1 hasta 3 días tras la infección, k=5: Desde 4 hasta 6 días tras la infección, k=6: Desde 7 hasta 9 días tras la infección, k= 7: desde 10 hasta 12 días tras la infección), por último se incluyó la interacción del estado sanitario de las glándulas con el periodo y con la sesión de ordeño. Como efecto aleatorio se consideró la glándula (ID: derecha o izquierda) anidada a la oveja (OV) para modelizar la covarianza entre las observaciones de las glándulas dentro de cada oveja (Barkema *et al*, 1997). Se utilizó un modelo de ajuste de la correlación de la varianza entre medidas repetidas del mismo animal de tipo "Compound Symmetry", al ser el que mejor ajuste presentó de acuerdo a los Aikake Iteration Criterion (AIC) y Bayesian Iteration Criterion (BIC).

Con el fin de analizar la evolución de las variables estudiadas en las ovejas libres de infección intramamaria, se asignó a cada animal sano uno infectado de referencia, de similar nivel productivo al que tenía antes de la infección y por lo tanto, mismo día de instauración de infección (en este caso, de no instauración de infección).

Relación de la composición y el contenido mineral de la leche con la CE.

Para el estudio de la relación de la composición físico-química de la leche con la CE se realizó una regresión lineal utilizando el programa PROC REG del paquete estadístico SAS (V.9.2. SAS Institute, 2012). Las variables independientes fueron: Grasa, Caseínas, Lactosa, Proteínas del suero, Cloruros, Sodio y Potasio. El contenido en Proteínas del suero, Cloruros y Sodio no fueron significativos, por lo que se eliminaron del modelo final.

Correlación de la CE con el RCS en la leche.

Se estudió la correlación entre la CE y el RCS de forma global y por intervalos de RCS ($RCS < 400 \times 10^3$ cel/mL y $RCS \geq 400 \times 10^3$ cel/mL), para lo que se utilizó el programa PROC CORR del paquete estadístico SAS (V.9.2. SAS Institute, 2012).

Estudio del comportamiento del prototipo desarrollado para la lectura on-line de la CE de la leche de oveja en salas de ordeño.

Para analizar el comportamiento del prototipo, en primer lugar se estudió la exactitud de la medida registrada por el prototipo, calculando la diferencia (DIF_{CE}) entre la medida de la CE registrada por el conductímetro de laboratorio, considerada de referencia (CE_{ref}) y la obtenida del prototipo (CE_{prot}), en cada ordeño realizado:

$$DIF_{CE} = CE_{ref} - CE_{prot}$$

En segundo lugar, y con el fin de estudiar la evolución del comportamiento del prototipo a lo largo del tiempo con respecto al conductímetro de referencia, se realizó una comparación de medias empleando un Modelo Lineal Mixto (Proc. Mixed, SAS V. 9.2, SAS Institute, 2012). Donde la variable dependiente fue la DIF_{CE} , como efecto fijo se tuvo en cuenta el tiempo transcurrido desde el inicio del experimento con tres niveles: ($i = 1$: del día 1 al 14; $i = 2$: del día 15 al 28; $i = 3$: del día 29 al 42 del experimento). Como efecto aleatorio se consideró la glándula (derecha o izquierda) anidada a la oveja para modelizar la covarianza entre las observaciones de las glándulas dentro de cada oveja (Barkema *et al*, 1997). Se utilizó un modelo de ajuste de la correlación de la varianza entre medidas repetidas del mismo animal de tipo “Compound Symmetry”, al ser el que mejor ajuste presentó de acuerdo a los Aikake Iteration Criterion (AIC) y Bayesian Iteration Criterion (BIC). Para el estudio de la evolución de la medida del prototipo se descartaron las medidas realizadas en las que la producción de la oveja fue inferior a 100 mL.

Estudio de diferentes algoritmos de cálculo para la detección automática de mamitis.

El estudio se realizó con las medidas de la CE registradas por el conductímetro de referencia (CE_{ref}) y por la CE obtenida por el prototipo (CE_{prot}). Además de estas variables (indicadoras del estado sanitario de las glándulas), se calculó la relación entre la CE de glándulas colaterales (RELCE) (indicadora del estado sanitario de la ubre del animal) a partir de la CE_{prot} y de la CE_{ref} . En función del estado sanitario de las glándulas de las ovejas, la RELCE se calculó como:

- la relación entre la CE de la glándula infectada respecto a la sana en los animales con infección unilateral
- la relación entre la CE de la glándula derecha y la CE de la glándula izquierda en el caso de animales sanos o infectados bilateralmente

Los algoritmos testados fueron:

- Desviaciones de CE (5, 10, 20, y 30%) sobre la media móvil, según diferentes horizontes temporales (4, 8, 10 y 14 días).

Regla 1 (R1): Se espera que la instauración de la infección provoque un incremento de la CE, por lo que se clasificaron como casos positivos aquellos en los que la CE fue superior a la de la media móvil de los 4, 8, 10, o 14 días anteriores en un 5, 10, 20 o 30 % aplicando la siguiente fórmula:

$$CE/\text{Media móvil (CE)}_{(4, 8, 10, 14 \text{ días})} > 1,05; 1,10; 1,20 \text{ ó } 1,30$$

Regla 2 (R2): En el caso de la RELCE, la instauración de una infección intramamaria bilateral puede dar lugar a un incremento (infección en la glándula del numerador) o a una disminución (infección en la glándula del denominador) de la variable. Para que se tuvieran en cuenta ambas posibilidades se clasificaron como casos positivos aquellos en los que la RELCE fue superior o inferior en un 5, 10, 15, 20 o 30% la media móvil de los días anteriores. La fórmula aplicada fue:

$$0,70; 0,80; 0,90; 0,95 > RELCE/\text{Media móvil (RELCE)}_{(4, 8, 10, 14 \text{ días})} > 1,05; 1,10; 1,20; 1,30$$

- Desviaciones sobre la desviación típica.

Se interpretó que se producían desviaciones fuera de lo normal cuando la variable (CE o RELCE) se desviaba de la media (CE_{med} o $RELCE_{med}$) más de 3 ó 4 veces la desviación típica (σ) de dicha media.

$$\text{Regla 3 (R3): } CE - CE_{med(4, 8, 10, 14 \text{ días})} > 3 \text{ ó } 4 \sigma_{(4, 8, 10, 14 \text{ días})}$$

Regla 4 (R4): En este caso, para tener en cuenta tanto los incrementos como las disminuciones de RELCE que pudieran darse, se dieron como positivos los casos en los que el valor absoluto de la diferencia entre la RELCE y la media de la RELCE de los 4, 8, 10 o 14 días anteriores era superior a 3 ó 4 veces la σ .

$$|\text{RELCE} - \text{RELCE}_{med(4, 8, 10, 14 \text{ días})}| > 3 \text{ ó } 4 \sigma_{(4, 8, 10, 14 \text{ días})}$$

Los algoritmos descritos se evaluaron de dos formas:

- Durante los cinco días posteriores a la instauración de la infección observando por separado cada uno de los cinco días.
- Durante los cinco días posteriores a la instauración de la infección, pero observando los cinco días en conjunto. Para que un caso fuera clasificado como negativo, no debía rebasarse el umbral en ninguno de los cinco días. Del mismo modo, una glándula se clasificaba como positiva si en alguno de los 5 días posteriores a la instauración de la infección resultaba que al menos un día el algoritmo lo clasificaba como positivo. Con esto se pretendía evitar que la elevación producida en los primeros días tras la instauración de la infección elevase la media y resultasen falsos negativos en días posteriores, al ser más difícil superar esa media.

Tras la aplicación de los distintos algoritmos, los casos positivos se clasificaron como verdaderos positivos (VP) si se correspondían con una glándula infectada, y de lo contrario como falsos positivos (FP). Los casos negativos se clasificaron en verdaderos negativos (VN) cuando se correspondían con glándulas sanas y falsos negativos (FN) cuando se trataba de glándulas infectadas.

A partir de los datos obtenidos, para las variables CE y RELCE, a partir de CE referencia y CE prototipo, se calculó la capacidad para la detección de la infección intramamaria (sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo y valor predictivo negativo) mediante el uso de los algoritmos descritos, siendo:

- Sensibilidad (Se): La capacidad del método para detectar los casos positivos, o la probabilidad de que una muestra positiva sea clasificada como tal ($VP/(VP+FN)$).
- Especificidad (Sp): La capacidad del método para detectar los casos negativos, o la probabilidad de que una muestra negativa sea clasificada como tal ($VN/(VN+FP)$).
- Valor Predictivo Positivo (VPP): Posibilidad de que una muestra clasificada como positiva esté realmente infectada ($VP/(VP+FP)$).
- Valor Predictivo Negativo (VPN): Posibilidad de que una muestra clasificada como negativa esté realmente sana ($VN/(VN+FN)$).



3. **RESULTADOS.**

3.1. **Incidencia y prevalencia de la infección.**

El experimento se inició con 26 ovejas cuyas glándulas estaban libres de infección intramamaria. Tras ser sometidas a SDS, se infectaron doce ovejas. Nueve de forma bilateral y tres de forma unilateral (Tabla V.1), suponiendo un total de 21 glándulas infectadas, por lo que la prevalencia tras las SDS fue del 42,87 % en glándulas y del 46,15 % en ovejas. Al partir de animales sanos, la incidencia a lo largo del experimento coincide con la prevalencia tras las SDS. Todas cursaron de forma subclínica, no dándose ningún caso de mamitis clínica.

Tabla V.1. Estado sanitario de las glándulas antes y después de ser sometidas a Situaciones Desfavorables para la Salud de la glándula mamaria (SDS).

	Primera parte del experimento			Segunda parte del experimento Tras someter a las glándulas a SDS			
	Sanas	Infección Unilateral	Infección Bilateral	Sanas	Infección Unilateral	Infección Bilateral	Total infectadas
Ovejas	23+3 ¹	0	0	11+3 ¹	3	9	12
Glándulas	49	0	0	28	3	18	21

1: Ovejas que poseían una sola glándula.

3.2. **Efecto de la instauración de la infección intramamaria en las variables estudiadas.**

En la Tabla V.2. se muestran los patógenos aislados de las glándulas infectadas y los valores de CE medios de 3 días antes y 3 días después del establecimiento de la infección, según el tipo de patógeno. La mayoría de los patógenos aislados pertenecen al género de las enterobacterias (71,43%). Cuando la infección se estableció de forma unilateral, solamente se observó un incremento de la CE en la glándula en la que se aislaron enterobacterias, aunque el incremento de CE (0,16 y 0,11 mS/cm en el ordeño de la mañana y de la tarde, respectivamente) no llegó a ser tan elevado como el observado en las

ovejas infectadas bilateralmente por el mismo patógeno (0,44 y 0,48 mS/cm en el ordeño de la mañana y de la tarde, respectivamente). En los casos en los que la infección se dio de forma bilateral se observó un elevado incremento de la CE cuando la infección fue producida por *Serratia marcescens* (0,81 mS/cm en el ordeño de la tarde), *Pantoea agglomerans* (0,23 mS/cm en el ordeño de la mañana y 0,64 mS/cm en el de la tarde), enterobacterias (0,44 y 0,48 mS/cm en el ordeño de la mañana y de la tarde, respectivamente), todas consideradas patógenos mayores, o por *Estafilococos spp.* (0,25 mS/cm).

Tabla V.2. CE de las glándulas infectadas en los 3 días previos y 3 días posteriores a la instauración de la infección según el microorganismo aislado

INFECCIÓN	N glándulas	Ordeño	CE (mS/cm) ± SD	
			3 días antes de infección	3 días después de infección
UNILATERAL				
<i>S. caprae</i>	1 (4,76%)	Mañana	4,03 ± 0,23	4,06 ± 0,08
		Tarde	3,88 ± 0,25	3,87 ± 0,11
<i>Estafilococos spp.</i>	1 (4,76%)	Mañana	4,22 ± 0,05	4,14 ± 0,11
		Tarde	4,02 ± 0,02	4,13 ± 0,14
Enterobacterias	1 (4,76%)	Mañana	4,01 ± 0,07	4,17 ± 0,38
		Tarde	3,93 ± 0,09	4,04 ± 0,18
BILATERAL				
<i>S. xylosus</i>	2 (9,52%)	Mañana	4,62 ± 0,24	4,62 ± 0,12
		Tarde	4,32 ± 0,18	4,32 ± 0,11
<i>Estafilococos spp.</i>	2 (9,52%)	Mañana	3,93 ± 0,05	4,07 ± 0,22
		Tarde	3,73 ± 0,09	3,98 ± 0,23
<i>Serratia marcescens</i>	2 (9,52%)	Mañana	4,87 ± 0,13	4,84 ± 0,81
		Tarde	4,49 ± 0,11	5,30 ± 1,76
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	4 (19,05%)	Mañana	4,54 ± 0,14	4,47 ± 0,28
		Tarde	4,22 ± 0,15	4,24 ± 0,19
<i>Pantoea agglomerans</i>	2 (9,52%)	Mañana	3,20 ± 0,16	3,43 ± 0,23
		Tarde	3,25 ± 0,16	3,89 ± 0,24
Enterobacterias	6 (28,57%)	Mañana	4,18 ± 0,28	4,62 ± 0,59
		Tarde	3,97 ± 0,19	4,45 ± 0,72

En la Tabla V.3. se muestran los resultados del análisis estadístico (valor F y nivel de significación) de los factores de variación de las variables estudiadas (Producción, CE y RCS). El periodo temporal respecto al momento de la instauración de la infección (PER) tuvo un efecto significativo en las tres variables estudiadas, al igual que la sesión de ordeño, siendo ésta la mayor responsable de las variaciones observadas en la CE y en la producción. En el caso del RCS el mayor responsable de su variación fue el PER, seguido de la sesión de ordeño ($F = 39,68$ y $38,85$, respectivamente).

El estado sanitario de las glándulas solo tuvo un efecto significativo en el RCS, pero su interacción con el PER y la sesión de ordeño fue significativa en las tres variables. En el caso de la CE y la producción, esto nos indica que aunque no se observen diferencias significativas entre los distintos estados infectivos de las glándulas, su comportamiento variará a lo largo del experimento y en cada uno de los dos ordeños.

Tabla V.3. Resultado del análisis estadístico (valor F y nivel de significación) de las variables LCE, LRCS y Producción de leche de las glándulas.

EFECTO	LCE		LRCS		Producción	
	F	N. S.	F	N. S.	F	N. S.
Periodo	6,09	<0,0001	39,68	<0,0001	12,12	<0,0001
Ordeño	86,30	<0,0001	38,85	<0,0001	593,74	<0,0001
Infección	0,22	0,8840	8,24	<0,0001	1,50	0,2133
Infección x Periodo x Ordeño	3,56	<0,0001	14,20	<0,0001	2,61	<0,0001

LCE: logaritmo de conductividad eléctrica. LRCS: logaritmo del recuento de células somáticas. N.S.: nivel de significación. Número de observaciones utilizadas en el modelo para LCE: 2028. Número de observaciones utilizadas en el modelo para LRCS: 1663. Número de observaciones utilizadas en el modelo para Producción: 2028.

En las Tablas V.4. y V.5. se muestra la evolución del LCE a lo largo de los periodos relativos al momento de la instauración de la infección en función del estado sanitario de las glándulas en el ordeño de la mañana y en el ordeño de la tarde, respectivamente.

De forma general, la CE medida en el ordeño de la tarde fue menor a la que se registró en el ordeño de la mañana a lo largo de todo el experimento y en los cuatro tipos de glándulas.

En las glándulas que permanecieron sanas a lo largo el experimento, ($INF=0$ e $INF=1$) solo se observaron ligeras oscilaciones de la CE a lo largo del experimento, sin observarse ninguna variación significativa de la CE debido al periodo de referencia de establecimiento de la infección, siendo la variación de la CE similar en los dos ordeños en

el caso de las glándulas con INF = 0, (animales libres de infección en ambas glándulas). En las glándulas con INF = 1 (glándulas libres de infección de animales infectados en una glándula) se observó una tendencia ascendente de la CE en el ordeño de la tarde, que no se vio en el ordeño de la mañana, pero en ningún ordeño se dieron diferencias significativas tras la instauración de la infección en la glándula colateral.

En las glándulas infectadas pertenecientes a ovejas que se infectaron de forma unilateral (INF = 2), a pesar de que hubo un ligero incremento de la CE en ambos ordeños tras el establecimiento de la infección, no se observaron diferencias significativas entre el periodo previo y el siguiente a la instauración de la infección. En cambio, en las glándulas de ovejas infectadas de forma bilateral sí se produjo un incremento significativo de 0,17 mS/cm en el ordeño de la mañana y de 0,26 mS/cm en el ordeño de la tarde en el primer periodo tras la instauración de la infección respecto al periodo anterior. Este incremento se mantuvo en el segundo periodo tras la instauración de la infección, para a continuación disminuir significativamente a los 7 días de la infección, hasta valores similares a los registrados en los periodos previos a la infección.

Tabla V.4. Evolución del LCE (media \pm error estándar, antilogaritmo de LCE (mS/cm)) del ordeño de la mañana según el estado sanitario de las glándulas y el periodo relativo a instauración de la infección.

INF	Días previos a la infección			Días posteriores a la infección			
	9-7	6-4	3-1	1-3	4-6	7-9	10-12
0	0,6194 ^{ab}	0,6181 ^{ab}	0,6227 ^a	0,6191 ^{ab}	0,6183 ^{ab}	0,6157 ^{ab}	0,6131 ^b
	$\pm 0,0101$	$\pm 0,0101$	$\pm 0,0101$	$\pm 0,0102$	$\pm 0,0102$	$\pm 0,0101$	$\pm 0,0101$
	(4,16)*	(4,15)	(4,19)	(4,16)	(4,15)	(4,13)	(4,10)
1	0,6101	0,6170	0,6001	0,6060	0,5957	0,6108	0,6062
	$\pm 0,0229$	$\pm 0,0231$	$\pm 0,0237$	$\pm 0,0231$	$\pm 0,0231$	$\pm 0,0229$	$\pm 0,0229$
	(4,07)	(4,14)	(3,98)	(4,04)	(3,94)	(4,08)	(4,04)
2	0,6091	0,6074	0,6087	0,6151	0,6145	0,6199	0,6092
	$\pm 0,0229$	$\pm 0,0231$	$\pm 0,0237$	$\pm 0,0229$	$\pm 0,0229$	$\pm 0,0229$	$\pm 0,0229$
	(4,07)	(4,05)	(4,06)	(4,12)	(4,12)	(4,17)	(4,07)
3	0,6111 ^a	0,6141 ^a	0,6250 ^b	0,6413 ^c	0,6446 ^c	0,6242 ^b	0,6307 ^b
	$\pm 0,0125$	$\pm 0,0125$	$\pm 0,0125$	$\pm 0,0125$	$\pm 0,0125$	$\pm 0,0125$	$\pm 0,0125$
	(4,08)	(4,11)	(4,22)	(4,38)	(4,41)	(4,21)	(4,27)

INF: Estado sanitario de las glándulas. (0: Ambas glándulas colaterales libres de infección todo el experimento; 1: Libre de infección todo el experimento cuya colateral se infecta durante el experimento; 2: Infectada durante el experimento cuya colateral permanece libre de infección; 3: Ambas glándulas colaterales infectadas durante el experimento.) (*) Antilogaritmo de LCE. (mS/cm) Diferentes superíndices en la misma fila indican diferencias significativas (P<0,05).

Tabla V.5. Evolución del LCE (media \pm error estándar, antilogaritmo de LCE (mS/cm)) del ordeño de la tarde según el estado sanitario de las glándulas y el periodo relativo a instauración de la infección.

INF	Días previos a la infección			Días posteriores a la infección			
	9-7	6-4	3-1	1-3	4-6	7-9	10-12
0	0,6018a	0,6064a	0,6060a	0,6036a	0,5955b	0,6001ab	0,5955b
	$\pm 0,0102$	$\pm 0,0101$	$\pm 0,0102$	$\pm 0,0101$	$\pm 0,0102$	$\pm 0,0101$	$\pm 0,0101$
	(4,00)*	(4,04)	(4,04)	(4,01)	(3,94)	(3,98)	(3,94)
1	0,5673a	0,5978bcd	0,6094bd	0,6119b	0,6122b	0,5759ac	0,5874ad
	$\pm 0,0229$	$\pm 0,0231$	$\pm 0,0237$	$\pm 0,0231$	$\pm 0,0231$	$\pm 0,0229$	$\pm 0,0229$
	(3,69)	(3,96)	(4,07)	(4,09)	(4,09)	(3,77)	(3,87)
2	0,5872	0,5906	0,5955	0,6032	0,6066	0,5932	0,5946
	$\pm 0,0229$	$\pm 0,0231$	$\pm 0,0237$	$\pm 0,0229$	$\pm 0,0229$	$\pm 0,0229$	$\pm 0,0229$
	(3,87)	(3,90)	(3,94)	(4,01)	(4,04)	(3,92)	(3,93)
3	0,5953a	0,6041ab	0,6017ab	0,6289c	0,6221c	0,6099b	0,6033ab
	$\pm 0,0126$	$\pm 0,0125$	$\pm 0,0125$	$\pm 0,0125$	$\pm 0,0126$	$\pm 0,0125$	$\pm 0,0125$
	(3,94)	(4,02)	(4,00)	(4,26)	(4,19)	(4,07)	(4,01)

INF: Estado sanitario de las glándulas. (0: Ambas glándulas colaterales libres de infección todo el experimento; 1: Libre de infección todo el experimento cuya colateral se infecta durante el experimento; 2: Infectada durante el experimento cuya colateral permanece libre de infección; 3: Ambas glándulas colaterales infectadas durante el experimento.) (*) Antilogaritmo de LCE. (mS/cm) Diferentes superíndices en la misma fila indican diferencias significativas ($P < 0,05$).

En las Tablas V.6 y V.7 se presentan los resultados de la comparación de medias de la variable Producción de las glándulas en los ordeños de la mañana y de la tarde, respectivamente.

Tanto en las glándulas libres de infección de animales sanos como de animales con infección unilateral se observó una fluctuación de la producción a lo largo de los periodos. Es de destacar que en el periodo previo al día de referencia de la instauración de la infección se observó un incremento de la producción en ambos grupos de glándulas.

Únicamente en las glándulas de ovejas con infección bilateral se registró un descenso significativo y relevante de la producción tras la instauración de la infección con respecto a los tres periodos previos. En el segundo periodo tras la instauración de la infección, la producción vuelve a los niveles registrados en los periodos previos, pero a partir del séptimo día tras la instauración de la infección, se produce una disminución significativa que se mantiene hasta la finalización del experimento en ambos ordeños.

En las glándulas infectadas de animales con infección unilateral no se observó ningún efecto de la instauración de la infección en el ordeño de la tarde. En el ordeño de la

mañana la variable fluctuó en los periodos previos a la instauración de la infección de forma similar a lo observado en las glándulas libres de infección, y descendió de forma significativa en los tres primeros días tras la instauración de la infección con respecto al periodo previo, para volver a incrementarse en el siguiente periodo, siguiendo un patrón similar a las oscilaciones observadas en los periodos previos a la infección.

Tabla V.6. Evolución de la Producción (mL) (media \pm error estándar) del ordeño de la mañana según el estado sanitario de las glándulas y el periodo relativo a instauración de la infección.

INF	Días previos a la infección			Días posteriores a la infección			
	9-7	6-4	3-1	1-3	4-6	7-9	10-12
0	367,38 ^{abc} $\pm 35,90$	343,49 ^{acd} $\pm 35,87$	388,66 ^b $\pm 35,87$	334,10 ^{ade} $\pm 35,89$	353,78 ^a $\pm 35,90$	300,86 ^c $\pm 35,87$	315,46 ^{de} $\pm 35,87$
1	471,11 $\pm 88,79$	431,44 $\pm 89,69$	452,59 $\pm 92,58$	418,92 $\pm 89,69$	369,81 $\pm 89,69$	415,56 $\pm 88,79$	376,44 $\pm 88,79$
2	686,67 ^{ab} $\pm 88,79$	560,84 ^c $\pm 89,69$	722,54 ^a $\pm 92,57$	539,44 ^{cd} $\pm 88,79$	636,67 ^{ac} $\pm 88,79$	565,00 ^c $\pm 88,79$	441,67 ^{bd} $\pm 88,79$
3	420,09 ^a $\pm 43,40$	412,04 ^a $\pm 43,40$	439,44 ^a $\pm 43,40$	345,35 ^b $\pm 43,45$	403,52 ^a $\pm 43,40$	319,44 ^b $\pm 43,40$	342,15 ^b $\pm 43,40$

INF: Estado sanitario de las glándulas. (0: Ambas glándulas colaterales libres de infección todo el experimento; 1: Libre de infección todo el experimento cuya colateral se infecta durante el experimento; 2: Infectada durante el experimento cuya colateral permanece libre de infección; 3: Ambas glándulas colaterales infectadas durante el experimento. Diferentes superíndices en la misma fila indican diferencias significativas ($P < 0,05$).

Tabla V.7. Evolución de la Producción (mL) (media \pm error estándar) del ordeño de la tarde según el estado sanitario de las glándulas y el periodo relativo a instauración de la infección.

INF	Días previos a la infección			Días posteriores a la infección			
	9-7	6-4	3-1	1-3	4-6	7-9	10-12
0	210,74 ^{ab} $\pm 35,87$	198,30 ^{ab} $\pm 35,87$	215,18 ^a $\pm 35,87$	190,34 ^{ab} $\pm 35,89$	191,81 ^{ab} $\pm 35,87$	179,29 ^b $\pm 35,87$	222,41 ^{ab} $\pm 35,87$
1	335,00 ^a $\pm 88,79$	233,81 ^{ab} $\pm 89,69$	287,25 ^{ab} $\pm 92,58$	278,30 ^{ab} $\pm 89,69$	232,92 ^b $\pm 89,69$	230,67 ^b $\pm 88,79$	231,56 ^b $\pm 88,79$
2	403,33 ^a $\pm 88,79$	308,34 ^{ab} $\pm 89,69$	315,21 ^{ab} $\pm 92,57$	328,78 ^{ab} $\pm 88,79$	274,44 ^b $\pm 88,79$	299,33 ^b $\pm 88,79$	267,78 ^b $\pm 88,79$
3	257,28 ^a $\pm 43,45$	251,61 ^{ac} $\pm 43,40$	260,81 ^a $\pm 43,40$	208,71 ^b $\pm 43,45$	221,88 ^{ab} $\pm 43,40$	196,04 ^b $\pm 43,40$	211,69 ^{bc} $\pm 43,40$

INF: Estado sanitario de las glándulas. (0: Ambas glándulas colaterales libres de infección todo el experimento; 1: Libre de infección todo el experimento cuya colateral se infecta durante el experimento; 2: Infectada durante el experimento cuya colateral permanece libre de infección; 3: Ambas glándulas colaterales infectadas durante el experimento.) Diferentes superíndices en la misma fila indican diferencias significativas ($P < 0,05$).

En las Tablas V.8 y V.9 se presentan los resultados de la comparación de medias del análisis estadístico de la variable LRCS de las glándulas en el ordeño de la mañana y en el de la tarde, respectivamente.

De forma general el RCS medido en el ordeño de la tarde fue superior al que se registró en el ordeño de la mañana.

El RCS de las glándulas sanas fluctuó a lo largo de los periodos estudiados. En las glándulas sanas de animales infectados unilateralmente, el RCS no presentó una tendencia clara, oscilando a lo largo del experimento sin registrarse diferencias significativas entre periodos consecutivos, al igual que ocurría con la producción.

En las glándulas infectadas, tanto en las pertenecientes a ovejas infectadas de forma unilateral (INF = 2) como las que se infectaron de forma bilateral (INF = 3) se produjo un incremento significativo y elevado del RCS en el periodo posterior a la instauración de la infección. Dicho incremento se mantuvo en las glándulas infectadas de ovejas con infección bilateral hasta el final del experimento, pero en las de ovejas de infección unilateral en los periodos siguientes el RCS descendió a valores similares, aunque ligeramente superiores, a los obtenidos en los periodos anteriores a la instauración de la infección.

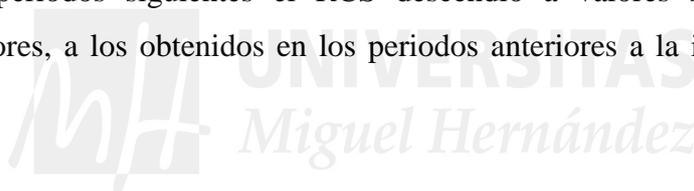


Tabla V.8. Evolución del LRCS (media \pm error estándar, antilogaritmo de LRCS ($\times 10^3$ cel/mL)) del ordeño de la mañana según el estado sanitario de las glándulas y el periodo relativo a la instauración de la infección.

INF	Días previos a la infección			Días posteriores a la infección			
	9-7	6-4	3-1	1-3	4-6	7-9	10-12
0	1,9208 ^{ab}	1,8760 ^a	1,8897 ^a	2,1006 ^b	1,9991 ^{ab}	2,0127 ^{ab}	1,9714 ^{ab}
	$\pm 0,0126$	$\pm 0,0856$	$\pm 0,0749$	$\pm 0,0752$	$\pm 0,0754$	$\pm 0,0749$	$\pm 0,0752$
	(83,33)*	(75,16)	(77,57)	(126,07)	(99,79)	(102,97)	(93,63)
1	1,9844	2,0133	1,9280	2,1553	2,3386	2,1215	2,3242
	$\pm 0,2699$	$\pm 0,2438$	$\pm 0,2156$	$\pm 0,2156$	$\pm 0,1909$	$\pm 0,1909$	$\pm 0,1909$
	(96,47)	(103,11)	(84,72)	(142,99)	(218,07)	(132,28)	(210,96)
2	2,2019 ^{ac}	2,2950 ^{ac}	2,2024 ^a	3,4904 ^b	2,5748 ^{ac}	2,7265 ^c	2,5922 ^{ac}
	$\pm 0,2699$	$\pm 0,2437$	$\pm 0,2154$	$\pm 0,1969$	$\pm 0,1909$	$\pm 0,1909$	$\pm 0,1909$
	(159,18)	(197,24)	(159,37)	(3,093,14)	(375,66)	(532,72)	(391,02)
3	0,6111 ^a	0,6141 ^a	0,6250 ^a	0,6413 ^b	0,6446 ^c	0,6242 ^c	0,6307 ^d
	$\pm 0,0125$	$\pm 0,0125$	$\pm 0,0125$	$\pm 0,0125$	$\pm 0,0125$	$\pm 0,0125$	$\pm 0,0125$
	(42,99)	(48,81)	(47,10)	(2,674,85)	(329,00)	(284,25)	(182,52)

INF: Estado sanitario de las glándulas. (0: Ambas glándulas colaterales libres de infección todo el experimento; 1: Libre de infección todo el experimento cuya colateral se infecta durante el experimento; 2: Infectada durante el experimento cuya colateral permanece libre de infección; 3: Ambas glándulas colaterales infectadas durante el experimento.) (*) Antilogaritmo de LRCS. ($\times 10^3$ cel/mL) Diferentes superíndices en la misma fila indican diferencias significativas ($P < 0,05$).

Tabla V.9. Evolución del LRCS (media \pm error estándar, antilogaritmo de LRCS ($\times 10^3$ cel/mL)) del ordeño de la mañana según el estado sanitario de las glándulas y el periodo relativo a la instauración de la infección.

INF	Días previos a la infección			Días posteriores a la infección			
	9-7	6-4	3-1	1-3	4-6	7-9	10-12
0	2,1487 ^{abc}	2,0911 ^{ac}	2,0562 ^a	2,2897 ^b	2,2262 ^{bc}	2,1100 ^{ac}	2,1285 ^{ac}
	$\pm 0,1026$	$\pm 0,0862$	$\pm 0,0754$	$\pm 0,0748$	$\pm 0,0749$	$\pm 0,0748$	$\pm 0,0749$
	(140,83)*	(123,34)	(113,82)	(194,85)	(168,34)	(128,82)	(134,43)
1	2,3875	2,4155	2,2372	2,3799	2,5368	2,3476	2,5762
	$\pm 0,3179$	$\pm 0,2699$	$\pm 0,2280$	$\pm 0,21561$	$\pm 0,20431$	$\pm 0,1909$	$\pm 0,1970$
	(244,06)	(260,32)	(172,66)	(239,83)	(344,19)	(222,64)	(376,88)
2	2,5034 ^a	2,6141 ^a	2,5281 ^a	3,5394 ^b	2,6991 ^a	2,9043 ^a	2,8518 ^a
	$\pm 0,2699$	$\pm 0,2699$	$\pm 0,2154$	$\pm 0,1909$	$\pm 0,1909$	$\pm 0,1909$	$\pm 0,1969$
	(318,71)	(411,24)	(337,36)	(3462,58)	(500,15)	(802,23)	(710,89)
3	1,9015 ^a	1,9022 ^a	1,9335 ^a	3,6772 ^b	2,5636 ^c	2,6009 ^c	2,3974 ^d
	$\pm 0,124$	$\pm 0,1021$	$\pm 0,0912$	$\pm 0,0916$	$\pm 0,0908$	$\pm 0,09122$	$\pm 0,09052$
	(79,71)	(79,84)	(85,80)	(4755,54)	(366,10)	(398,93)	(249,69)

INF: Estado sanitario de las glándulas. (0: Ambas glándulas colaterales libres de infección todo el experimento; 1: Libre de infección todo el experimento cuya colateral se infecta durante el experimento; 2: Infectada durante el experimento cuya colateral permanece libre de infección; 3: Ambas glándulas colaterales infectadas durante el experimento.) (*) Antilogaritmo de LRCS ($\times 10^3$ cel/mL). Diferentes superíndices en la misma fila indican diferencias significativas ($P < 0,05$).

3.3. Relación de la CE con la composición de la leche y el contenido mineral.

En la Tabla V.10 se muestran los resultados del análisis de regresión realizado para estudiar la relación de la CE con la composición de la leche y el contenido mineral, observándose un alto coeficiente global de regresión ($R^2=0,83$). El contenido en lactosa fue la principal responsable de las variaciones observadas en la CE, seguida por el contenido en caseína de la leche, el Potasio y la Grasa. El único que presentó una relación positiva con la CE fue el Potasio, por lo que una disminución de la lactosa, la caseína o la grasa en leche estará relacionado con un incremento de la CE. El resto de minerales en leche analizados (Cloruros y Sodio) no tuvieron un efecto significativo, por lo que fueron eliminados del modelo definitivo, al igual que la proteína del suero.

Tabla V.10. Relación de la CE con la composición de la leche y su contenido mineral.

Variables	Estadístico			Modelo
	Parámetro	SE	R^2 parcial	
Intercepto	1,7280	$\pm 0,0497$		N= 1872
LACTOSA (%)	-0,1982	$\pm 0,0099$	0,4325	$R^2 = 0,83$
CASEÍNA (%)	-0,0544	$\pm 0,0041$	0,3871	P-valor: <0,0001
POTASIO (mg/L)	0,00002	$\pm 0,00001$	0,0049	F- valor: 193,63
GRASA (%)	-0,0032	$\pm 0,0015$	0,0050	

SE: error estándar; R^2 : coeficiente de regresión; ns: nivel de significación; n: número de observaciones.

3.4. Correlación del RCS y la CE de la leche.

En la Tabla V.11. se muestran los resultados del estudio de la correlación de la CE y el RCS. A pesar de que los coeficientes obtenidos fueron muy bajos, todos fueron significativos. Los coeficientes obtenidos en el ordeño de la tarde fueron mayores que los obtenidos en el ordeño de la mañana, tanto de forma global como en los dos intervalos de RCS. En los casos de altos RCS se obtuvieron coeficientes de correlación superiores a los registrados para bajos RCS, por lo que el mayor coeficiente de correlación entre la CE y el RCS se dio en el ordeño de la tarde cuando el RCS fue superior a 400×10^3 cel/mL ($r=0,47$).

Tabla V.11. Correlación de la CE y el RCS.

Intervalo de RCS ($\times 10^3$ cel/mL)	Ordeño				Total	
	Matutino		Vespertino			
	r	n	r	n	r	n
RCS<400	0,12***	705	0,15**	663	0,06*	1368
RCS \geq 400	0,39***	131	0,47***	156	0,43***	287
Total	0,30***	836	0,39***	819	0,33***	1655

r: coeficiente de correlación; n: número de observaciones utilizadas. *P<0,05; **P<0,01; ***P<0,001.

3.5. Estudio del comportamiento del prototipo para la medida on-line de la CE de la leche.

En la Tabla V.12 viene reflejada la conductividad media (CE_{med}) medida durante el ordeño diario (mañana y tarde) con el conductímetro de referencia (C_{ref}) y con el prototipo (C_{prot}), así como la diferencia entre ambas. Se puede observar que la CE_{prot} es mayor que CE_{ref} . Así mismo, la desviación estándar (σ) de la CE_{prot} también es superior a la de la CE_{med}

Tabla V.12. Conductividad eléctrica media medida con el conductímetro de referencia (CE_{ref}), con el prototipo (CE_{prot}) y la diferencia entre ambas.

	n	CE_{med} (mS/cm)	σ	máx	mín
CE_{ref} (mS/cm)	3760	4,0550	0,4494	8,870	2,380
CE_{prot} (mS/cm)	3472	4,1444	0,6389	7,745	0,202
Diferencia ($CE_{ref} - CE_{prot}$) (mS/cm)	3458	-0,0938	0,5494	3,72	-2,164

n: número de observaciones. σ : Desviación estándar. máx y mín: valores máximos y mínimos observados.

En las Tablas V.13 y V.14 se muestra la conductividad media (CE_{med}) medida durante el ordeño de la mañana y de la tarde, respectivamente, con el conductímetro de referencia (CE_{ref}) y con el prototipo (C_{prot}), así como la diferencia entre ambas. Se observa que al desglosar los datos, la CE_{prot} es mayor a la CE_{ref} en ambos ordeños, siendo más acusada la diferencia entre ambos equipos en el ordeño de la tarde.

Tabla V.13. Conductividad eléctrica media medida con el conductímetro de referencia (CE_{ref}), con el prototipo (CE_{prot}) y la diferencia entre ambas en el ordeño matutino.

	n	CE_{med} (mS/cm)	σ	máx	mín
CE_{ref} (mS/cm)	2011	4,1567	0,4546	7,820	2,860
CE_{prot} (mS/cm)	1850	4,2432	0,5938	7,745	0,432
Diferencia ($CE_{ref} - CE_{prot}$) (mS/cm)	1843	-0,0908	0,5023	2,878	-1,552

n: número de observaciones. σ : Desviación estándar. CV: Coeficiente de variación.
máx y mín: valores máximos y mínimos observados.

Tabla V.14. Conductividad eléctrica media medida con el conductímetro de referencia (CE_{ref}), con el prototipo (CE_{prot}) y la diferencia entre ambas en el ordeño de la tarde.

	n	CE_{med} (mS/cm)	σ	máx	mín
CE_{ref} (mS/cm)	1749	3,9381	0,4135	8,870	2,380
CE_{prot} (mS/cm)	1622	4,0317	0,6693	7,448	0,202
Diferencia ($CE_{ref} - CE_{prot}$) (mS/cm)	1615	-0,0972	0,5988	3,718	-2,164

n: número de observaciones. σ : Desviación estándar. CV: Coeficiente de variación.
máx y mín: valores máximos y mínimos observados.

3.5.1. Evolución de la lectura de CE realizada por el prototipo a lo largo del experimento.

En la Tabla V.15 se muestran los resultados del análisis estadístico (valor F y nivel de significación) del intervalo transcurrido en la diferencia de CE entre la CE_{ref} y la CE_{prot} . El intervalo de tiempo tuvo un efecto significativo en la diferencia entre la CE_{ref} y la CE_{prot} , lo que indica que la diferencia de CE medida por ambos conductímetros no es constante a lo largo del experimento.

Tabla V.15. Test de efectos fijos, valor F y probabilidad en el análisis de Diferencia de CE de referencia y prototipo.

Efecto	valor F	Nivel significación
Intervalo	74,74	<0,0001

En la Tabla V.16 podemos ver la evolución que sigue la diferencia entre la CE_{ref} y la CE_{prot} , siendo positiva al principio y como se va reduciendo a medida que avanza el experimento para pasar a ser negativa al final de éste. En las primeras semanas, la medida tomada por el prototipo era inferior a la registrada por el conductímetro de referencia, pero según transcurre el experimento esta tendencia cambia para ser mayor. Esto indica una descalibración del prototipo a lo largo del tiempo, que nos alerta de la necesidad de una calibración regular del mismo.

Tabla V.16. Media de la diferencia entre la medida del conductímetro de referencia y la del prototipo a lo largo del experimento.

Intervalo	Diferencia de CE (mS/cm)	Error estándar
1: días 1 al 14	0,03737 ^a	0,04447
2: días 15 al 28	- 0,02690 ^b	0,04463
3: días 29 al 42	- 0,20740 ^c	0,04444

Diferentes superíndices en la misma columna indican diferencias significativas ($P < 0,05$).

3.6. Comportamiento de distintos algoritmos de cálculo para la detección de mamitis.

3.6.1. Capacidad de detección de mamitis de los algoritmos estudiados teniendo en cuenta los cinco días posteriores a la instauración de la infección por separado.

En las Tablas V.17 y V.18 se muestran los resultados de Se, Sp, VPP y VPN obtenidos en el ordeño de la mañana y de la tarde, respectivamente, al aplicar las reglas R1, R2, R3 y R4 a las medidas de CE tomadas con el conductímetro de referencia, teniendo en cuenta los cinco días posteriores a la instauración de la infección por separado. En ambos ordeños se han obtenido resultados similares, aunque superiores en el ordeño de la mañana con respecto a la tarde en el caso de R1 y R2, al contrario que en R3 y R4, que presentaron resultados superiores en el ordeño de la tarde. El incremento del umbral de discriminación, en todos los casos ha provocado una disminución de la Se y un incremento de la Sp, independientemente de la regla aplicada o del horizonte temporal tenido en cuenta para el cálculo de la media y la σ . La Se, ha sido mayor con la RELCE que con la CE, pero también se ha obtenido menor Sp.

En ambos ordeños, los mejores resultados se obtuvieron al aplicar la R2 con un umbral del 5% y teniendo en cuenta un horizonte temporal de 14 días (Se del 47,7 y 51,1% y Sp del 77,1 y 86,2%, en el ordeño de mañana y tarde, respectivamente), pero a pesar de ello aún habría en torno a un 30% de casos (tanto positivos como negativos) clasificados incorrectamente.

Tabla V.17. Resultados de Se, Sp, VPP y VPN al aplicar los algoritmos* a las medidas de CE del conductímetro de referencia en el ordeño de la mañana, considerando los cinco días posteriores a la instauración de la infección por separado.

Horizonte temporal	R1				R2				R3		R4		
	5%	10%	20%	30%	5%	10%	20%	30%	3 σ	4 σ	3 σ	4 σ	
4 días	Se (%)	25,3	11,0	4,4	3,3	40,9	18,2	9,1	0,0	9,9	8,8	15,9	13,6
	Sp (%)	93,5	98,7	99,3	99,3	80,0	94,3	100,0	100,0	96,7	97,4	82,9	94,3
	VPP (%)	69,7	83,3	80,0	75,0	56,3	66,7	100,0	0,0	64,3	66,7	36,8	60,0
	VPN (%)	67,8	65,1	63,6	63,3	68,3	64,7	63,6	61,4	64,3	64,2	61,1	63,5
	n	244	244	244	244	114	114	114	114	244	244	114	114
8 días	Se (%)	29,7	14,3	5,5	3,3	40,9	18,2	6,8	0,0	7,7	6,6	22,7	13,6
	Sp (%)	92,8	98,7	99,3	99,3	78,6	94,3	100,0	100,0	98,7	99,3	91,4	97,1
	VPP (%)	71,1	86,7	83,3	75,0	54,5	66,7	100,0	0,0	77,8	85,7	62,5	75,0
	VPN (%)	68,9	65,9	63,9	63,3	67,9	64,7	63,1	61,4	64,3	64,1	65,3	64,2
	n	244	244	244	244	114	114	114	114	244	244	114	114
10 días	Se (%)	33,0	13,2	5,5	3,3	40,9	13,6	6,8	0,0	8,8	5,5	22,7	13,6
	Sp (%)	94,1	98,7	99,3	99,3	81,4	95,7	100,0	100,0	99,3	99,3	95,7	95,7
	VPP (%)	76,9	85,7	83,3	75,0	58,1	66,7	100,0	0,0	88,9	83,3	76,9	66,7
	VPN (%)	70,2	65,7	63,9	63,3	68,7	63,8	63,1	61,4	64,7	63,9	66,3	63,8
	n	244	244	244	244	114	114	114	114	244	244	114	114
14 días	Se (%)	37,4	16,5	6,6	3,3	47,7	15,9	6,8	0,0	8,8	6,6	20,5	13,6
	Sp (%)	90,8	99,3	99,3	99,3	77,1	95,7	100,0	100,0	99,3	99,3	94,3	97,1
	VPP (%)	70,8	93,8	85,7	75,0	56,8	70,0	100,0	0,0	88,9	85,7	69,2	75,0
	VPN (%)	70,9	66,7	64,1	63,3	70,1	64,4	63,1	61,4	64,7	64,1	65,3	64,2
	n	244	244	244	244	114	114	114	114	244	244	114	114

*Consultar Materiales y Métodos para la definición de las reglas. Se: Sensibilidad. Sp: Especificidad. VPP: Valor Predictivo Positivo. VPN: Valor Predictivo Negativo. n: número de casos.

Tabla V.18. Resultados de Se, Sp, VPP y VPN al aplicar los algoritmos* a las medidas de CE del conductímetro de referencia en el ordeño de la tarde, considerando los cinco días posteriores a la instauración de la infección por separado.

Horizonte temporal		R1				R2				R3		R4	
		5%	10%	20%	30%	5%	10%	20%	30%	3 σ	4 σ	3 σ	4 σ
4 días	Se (%)	18,5	7,6	3,3	3,3	47,9	22,9	6,3	4,2	12,0	9,8	22,9	14,6
	Sp (%)	93,3	99,3	99,3	100,0	83,1	98,5	100,0	100,0	98,7	99,3	89,2	95,4
	VPP (%)	63,0	87,5	75,0	100,0	67,6	91,7	100,0	100,0	84,6	90,0	61,1	70,0
	VPN (%)	65,1	63,7	62,6	62,8	68,4	63,4	59,1	58,6	64,6	64,2	61,1	60,2
	n	242	242	242	242	113	113	113	113	242	242	113	113
8 días	Se (%)	23,9	8,7	3,3	3,3	42,6	21,3	4,3	2,1	10,9	8,7	10,6	6,4
	Sp (%)	96,0	99,3	100,0	100,0	83,1	100,0	100,0	100,0	99,3	100,0	98,5	100,0
	VPP (%)	78,6	88,9	100,0	100,0	64,5	100,0	100,0	100,0	90,9	100,0	83,3	100,0
	VPN (%)	67,3	63,9	62,8	62,8	66,7	63,7	59,1	58,6	64,5	64,1	60,4	59,6
	n	242	242	242	242	112	112	112	112	242	242	112	112
10 días	Se (%)	22,8	10,9	3,3	3,3	48,9	25,5	4,3	2,1	9,8	7,6	10,6	8,5
	Sp (%)	96,0	99,3	100,0	100,0	84,6	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	98,5	100,0
	VPP (%)	77,8	90,9	100,0	100,0	69,7	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	83,3	100,0
	VPN (%)	67,0	64,5	62,8	62,8	69,6	65,0	59,1	58,6	64,4	63,8	60,4	60,2
	n	242	242	242	242	112	112	112	112	242	242	112	112
14 días	Se (%)	27,2	14,1	4,3	3,3	51,1	25,5	4,3	2,1	7,6	4,3	8,5	4,3
	Sp (%)	92,0	98,7	100,0	100,0	86,2	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0
	VPP (%)	67,6	86,7	100,0	100,0	72,7	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0
	VPN (%)	67,3	65,2	63,0	62,8	70,9	65,0	59,1	58,6	63,8	63,0	60,2	59,1
	n	242	242	242	242	112	112	112	112	242	242	112	112

*Consultar Materiales y Métodos para la definición de las reglas. Se: Sensibilidad. Sp: Especificidad. VPP: Valor Predictivo Positivo. VPN: Valor Predictivo Negativo. n: número de casos.

En las Tablas V.19 y V.20 se muestran los resultados de Se, Sp, VPP y VPN obtenidos en ambos ordeños al aplicar las reglas R1, R2, R3 y R4 a las medidas de CE tomadas con el prototipo teniendo en cuenta los cinco días posteriores a la instauración de la infección por separado. De forma similar con lo observado con las medidas tomadas con el conductímetro de referencia, se observa una disminución de la sensibilidad a medida que aumenta el umbral de discriminación. En este caso, la mejor sensibilidad también se ha obtenido al aplicar la R2 (RELCE) con un umbral del 5 %, llegando a obtenerse una Se del 71,8 % al aplicar este algoritmo teniendo en cuenta la media móvil de los 10 ordeños anteriores, pero un VPP del 43,8 %. De forma general, con los datos tomados por el prototipo mejora ligeramente la Se respecto a la obtenida con el conductímetro de referencia, pero también ha aumentado el número de FP. Con las reglas basadas en la detección de las variaciones sobre la σ (R3 y R4), se ha obtenido una baja Se y alta Sp en

ambos ordeños, con un VPN en torno al 60 % (similar al obtenido en R1 y R2) por lo habría un alto porcentaje de muestras infectadas clasificadas como sanas.

Tabla V.19. Resultados de Se, Sp , VPP y VPN al aplicar los algoritmos* a las medidas de CE del prototipo en el ordeño de la mañana, considerando los cinco días posteriores a la instauración de la infección por separado.

Horizonte temporal	R1				R2				R3		R4		
	5%	10%	20%	30%	5%	10%	20%	30%	3 σ	4 σ	3 σ	4 σ	
4 días	Se (%)	20,2	12,4	7,9	2,2	71,4	40,5	28,6	9,2	6,7	4,5	16,7	11,9
	Sp (%)	85,9	91,5	98,6	99,3	36,5	65,1	100,0	100,0	97,9	97,9	92,1	93,7
	VPP (%)	47,4	47,8	77,8	66,7	42,9	43,6	100,0	100,0	66,7	57,1	58,3	55,6
	VPN (%)	63,2	62,5	63,1	61,8	65,7	62,1	67,7	64,4	62,6	62,1	62,4	61,5
	n	231	231	231	231	105	105	105	201	231	231	105	105
8 días	Se (%)	21,3	10,1	7,9	3,4	70,7	39,0	26,8	19,5	4,5	3,4	9,8	7,3
	Sp (%)	86,6	92,3	98,6	99,3	34,9	73,0	98,4	100,0	98,6	99,3	98,4	100,0
	VPP (%)	50,0	45,0	77,8	75,0	41,4	48,5	91,7	100,0	66,7	75,0	80,0	100,0
	VPN (%)	63,7	62,1	63,1	62,1	64,7	64,8	67,4	65,6	62,2	62,1	62,6	62,4
	n	231	231	231	231	104	104	104	104	231	231	104	104
10 días	Se (%)	22,5	13,5	9,0	3,4	71,8	38,5	28,2	20,5	4,5	2,2	9,6	6,8
	Sp (%)	83,1	93,7	98,6	99,3	42,9	81,0	98,4	100,0	100,0	100,0	99,1	99,1
	VPP (%)	45,5	57,1	80,0	75,0	43,8	55,6	91,7	100,0	100,0	100,0	87,5	83,3
	VPN (%)	63,1	63,3	63,3	62,1	71,1	68,0	68,9	67,0	62,6	62,0	61,8	61,1
	n	231	231	231	231	102	102	102	102	231	231	181	181
14 días	Se (%)	36,0	15,7	9,0	6,7	62,2	37,8	27,0	18,9	2,2	2,2	8,1	2,7
	Sp (%)	73,9	90,1	96,5	98,6	42,9	79,4	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0
	VPP (%)	46,4	50,0	61,5	75,0	39,0	51,9	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0
	VPN (%)	64,8	63,1	62,8	62,8	65,9	68,5	70,0	67,7	62,0	62,0	64,9	63,6
	n	231	231	231	231	100	100	100	100	231	231	100	100

*Consultar Materiales y Métodos para la definición de las reglas. Se: Sensibilidad. Sp: Especificidad. VPP: Valor Predictivo Positivo. VPN: Valor Predictivo Negativo. n: número de casos.

Tabla V.20. Resultados de Se, Sp, VPP y VPN al aplicar los algoritmos* a las medidas de CE del prototipo en el ordeño de la tarde, considerando los cinco días posteriores a la instauración de la infección por separado.

Horizonte temporal	R1				R2				R3		R4		
	5%	10%	20%	30%	5%	10%	20%	30%	3 σ	4 σ	3 σ	4 σ	
4 días	Se (%)	32,9	19,5	9,8	6,1	75,0	52,5	25,0	17,5	7,3	6,1	17,5	15,0
	Sp (%)	78,5	87,7	96,9	98,5	28,6	53,6	83,9	87,5	97,7	98,5	82,1	92,9
	VPP (%)	49,1	50,0	66,7	71,4	42,9	44,7	52,6	50,0	66,7	71,4	41,2	60,0
	VPN (%)	65,0	63,3	63,0	62,4	61,5	61,2	61,0	59,8	62,6	62,4	58,2	60,5
	n	212,0	212,0	212,0	212,0	96,0	96,0	96,0	96,0	212,0	212,0	96,0	96,0
8 días	Se (%)	32,9	22,0	9,8	6,1	75,0	50,0	25,0	17,5	4,9	4,9	10,0	7,5
	Sp (%)	78,5	86,9	98,5	99,2	33,9	66,1	85,7	91,1	100,0	100,0	89,3	96,4
	VPP (%)	49,1	51,4	80,0	83,3	44,8	51,3	55,6	58,3	100,0	100,0	40,0	60,0
	VPN (%)	65,0	63,8	63,4	62,6	65,5	64,9	61,5	60,7	62,5	62,5	58,1	59,3
	n	212,0	212,0	212,0	212,0	96,0	96,0	96,0	96,0	212,0	212,0	96,0	96,0
10 días	Se (%)	34,1	19,5	11,0	6,1	77,5	52,5	22,5	17,5	4,9	4,9	7,5	5,0
	Sp (%)	76,9	88,5	96,2	99,2	35,7	69,6	85,7	89,3	100,0	100,0	92,9	96,4
	VPP (%)	48,3	51,6	64,3	83,3	46,3	55,3	52,9	53,8	100,0	100,0	42,9	50,0
	VPN (%)	64,9	63,5	63,1	62,6	69,0	67,2	60,8	60,2	62,5	62,5	58,4	58,7
	n	212,0	212,0	212,0	212,0	96,0	96,0	96,0	96,0	212,0	212,0	96,0	96,0
14 días	Se (%)	42,7	34,1	14,6	8,5	70,0	55,0	22,5	15,0	4,9	2,4	7,5	2,5
	Sp (%)	70,0	77,7	92,3	96,2	33,9	58,9	83,9	92,9	99,2	100,0	92,9	100,0
	VPP (%)	47,3	49,1	54,5	58,3	43,1	48,9	50,0	60,0	80,0	100,0	42,9	100,0
	VPN (%)	65,9	65,2	63,2	62,5	61,3	64,7	60,3	60,5	62,3	61,9	58,4	58,9
	n	212,0	212,0	212,0	212,0	96,0	96,0	96,0	96,0	212,0	212,0	96,0	96,0

*Consultar Materiales y Métodos para la definición de las reglas. Se: Sensibilidad. Sp: Especificidad. VPP: Valor Predictivo Positivo. VPN: Valor Predictivo Negativo. n: número de casos.

3.6.2. Capacidad de detección de mamitis de los algoritmos estudiados teniendo en cuenta los cinco días posteriores a la instauración de la infección en conjunto.

En las Tablas V.21 y V.22 se muestran los resultados de Se, Sp, VPP y VPN obtenidos en ambos ordeños al aplicar las reglas R1, R2, R3 y R4 a las medidas de CE tomadas con el conductímetro de referencia, teniendo en cuenta los cinco días posteriores a la instauración de la infección en conjunto.

En el ordeño de la mañana se han obtenido una alta Se y una alta Sp al aplicar la R1 con un umbral del 5 %. Independientemente del horizonte temporal, los valores registrados están en torno al 70 % para Se y Sp, al igual que el VPP y el VPN. En esta ocasión, la R2 obtiene elevada Se (91,7%) pero menor Sp que R1 (45,5-63,6%). La R4 obtiene mejores resultados que R3; aplicando 3 σ y calculando la media con los diez días anteriores al establecimiento de la infección: se consigue una Se del 91,7 % y una Sp del 90,9 %, con un VPP y VPN también en torno al 90%.

Tabla V.21. Resultados de Se, Sp, VPP y VPN al aplicar los algoritmos* a las medidas de CE del conductímetro de referencia en el ordeño de la mañana, considerando 5 días post-infección conjuntamente.

Horizonte temporal		R1				R2				R3		R4	
		5%	10%	20%	30%	5%	10%	20%	30%	3 σ	4 σ	3 σ	4 σ
4 días	Se (%)	77,3	36,4	18,2	13,6	91,7	58,3	25,0	0,0	40,9	36,4	75,0	58,3
	Sp (%)	70,4	92,6	96,3	96,3	54,5	100,0	100,0	100,0	81,5	85,2	36,4	81,8
	VPP (%)	68,0	80,0	80,0	75,0	68,8	100,0	100,0	0,0	64,3	66,7	56,3	77,8
	VPN (%)	79,2	64,1	59,1	57,8	85,7	68,8	55,0	47,8	62,9	62,2	57,1	64,3
	n	49	49	49	49	23	23	23	23	49	49	23	23
8 días	Se (%)	72,7	45,5	18,2	13,6	91,7	58,3	25,0	0,0	31,8	27,3	91,7	58,3
	Sp (%)	77,8	92,6	96,3	96,3	45,5	100,0	100,0	100,0	92,6	96,3	63,6	90,9
	VPP (%)	72,7	83,3	80,0	75,0	64,7	100,0	100,0	0,0	77,8	85,7	73,3	87,5
	VPN (%)	77,8	67,6	59,1	57,8	83,3	68,8	55,0	47,8	62,5	61,9	87,5	66,7
	n	49	49	49	49	23	23	23	23	49	49	23	23
10 días	Se (%)	72,7	40,9	18,2	13,6	91,7	50,0	25,0	0,0	36,4	22,7	91,7	66,7
	Sp (%)	85,2	92,6	96,3	96,3	63,6	100,0	100,0	100,0	96,3	96,3	90,9	90,9
	VPP (%)	80,0	81,8	80,0	75,0	73,3	100,0	100,0	0,0	88,9	83,3	91,7	88,9
	VPN (%)	79,3	65,8	59,1	57,8	87,5	64,7	55,0	47,8	65,0	60,5	90,9	71,4
	n	49	49	49	49	23	23	23	23	49	49	23	23
14 días	Se (%)	77,3	45,5	18,2	13,6	91,7	58,3	25,0	0,0	31,8	27,3	75,0	58,3
	Sp (%)	74,1	96,3	96,3	96,3	45,5	100,0	100,0	100,0	96,3	96,3	90,9	100,0
	VPP (%)	70,8	90,9	80,0	75,0	64,7	100,0	100,0	0,0	87,5	85,7	90,0	100,0
	VPN (%)	80,0	68,4	59,1	57,8	83,3	68,8	55,0	47,8	63,4	61,9	76,9	68,8
	n	49	49	49	49	23	23	23	23	49	49	23	23

*Consultar Materiales y Métodos para la definición de las reglas. Se: Sensibilidad. Sp: Especificidad. VPP: Valor Predictivo Positivo. VPN: Valor Predictivo Negativo. n: número de casos.

En el ordeño de la tarde, también ha mejorado la capacidad de detección de glándulas infectadas al considerar los cinco días conjuntamente, con resultados similares a los obtenidos con el ordeño de la mañana, en la mayoría de los casos.

En general en ambos ordeños se observa el mismo comportamiento que al considerar los datos por separado, a medida que se aumenta el umbral de alarma se produce una disminución de la Se de los métodos, que va acompañado de un incremento de la Sp .

Tabla V.22. Resultados de Se, Sp, VPP y VPN al aplicar los algoritmos* a las medidas de CE del conductímetro de referencia en el ordeño de la tarde, considerando 5 días post-infección conjuntamente.

Horizonte temporal		R1				R2				R3		R4	
		5%	10%	20%	30%	5%	10%	20%	30%	3 σ	4 σ	3 σ	4 σ
4 días	Se (%)	72,7	31,8	13,6	13,6	91,7	50,0	16,7	16,7	45,5	40,9	83,3	50,0
	Sp (%)	70,4	96,3	96,3	100	36,4	90,9	100	100	92,6	96,3	45,5	72,7
	VPP (%)	66,7	87,5	75,0	100	61,1	85,7	100	100	83,3	90,0	62,5	66,7
	VPN (%)	76,0	63,4	57,8	58,7	80,0	62,5	52,4	52,4	67,6	66,7	71,4	57,1
	n	49	49	49	49	23	23	23	23	49	49	23	23
8 días	Se (%)	68,2	36,4	13,6	13,6	91,7	50,0	16,7	8,3	45,5	36,4	41,7	25,0
	Sp (%)	85,2	96,3	100	100	36,4	100	100	100	96,3	100	90,9	100,0
	VPP (%)	78,9	88,9	100	100	61,1	100	100	100	90,9	100	83,3	100,0
	VPN (%)	76,7	65,0	58,7	58,7	80,0	64,7	52,4	50,0	68,4	65,9	58,8	55,0
	n	49	49	49	49	23	23	23	23	49	49	23	23
10 días	Se (%)	63,6	40,9	13,6	13,6	91,7	58,3	16,7	8,3	40,9	31,8	50,0	33,3
	Sp (%)	85,2	96,3	100	100	45,5	100	100	100	100	100	100	100
	VPP (%)	77,8	90,0	100	100	64,7	100	100	100	100	100	100	100
	VPN (%)	74,2	66,7	58,7	58,7	83,3	68,8	52,4	50,0	67,5	64,3	64,7	57,9
	n	49	49	49	49	23	23	23	23	49	49	23	23
14 días	Se (%)	68,2	40,9	18,2	13,6	100,0	58,3	16,7	8,3	31,8	18,2	33,3	16,7
	Sp (%)	70,4	92,6	100	100	54,5	100	100	100	100	100	100	100
	VPP (%)	65,2	81,8	100	100	70,6	100	100	100	100	100	100	100
	VPN (%)	73,1	65,8	60,0	58,7	100,0	68,8	52,4	50,0	64,3	60,0	57,9	52,4
	n	49	49	49	49	23	23	23	23	49	49	23	23

*Consultar Materiales y Métodos para la definición de las reglas. Se: Sensibilidad. Sp: Especificidad. VPP: Valor Predictivo Positivo. VPN: Valor Predictivo Negativo. n: número de casos.

En las Tablas V.23 y V.24 se muestran los resultados de Se, Sp, VPP y VPN obtenidos en ambos ordeños al aplicar las reglas R1, R2, R3 y R4 a las medidas de CE tomadas con el prototipo teniendo en cuenta los cinco días posteriores a la instauración de la infección en conjunto.

De forma general, si comparamos con los datos obtenidos al considerar los cinco días por separado, se ve un incremento de la Se, llegando a obtenerse una Se del 70%, o incluso del 100% con la R2 al aplicando un umbral del 5%, pero este método no sería válido al no ser capaz de detectar los casos negativos. Al aplicar la misma regla, pero con un umbral del 20%, la sensibilidad es del 55,6% con un horizonte temporal de 4, 8 o 10 días con una Sp en torno al 80% con un VPP y VPN que oscilan en torno al 70%. En el ordeño de la tarde, aunque se ve un incremento general de la Se, la Sp disminuye con respecto a la registrada por la mañana.

Tabla V.23. Resultados de Se, Sp, VPP y VPN al aplicar los algoritmos a las medidas de CE del prototipo en el ordeño de la mañana, considerando 5 días post-infección conjuntamente.

Horizonte temporal		R1*				R2				R3		R4	
		5%	10%	20%	30%	5%	10%	20%	30%	3σ	4σ	3σ	4σ
4 días	Se (%)	64,7	47,1	29,4	5,9	77,8	77,8	55,6	33,3	23,5	11,8	55,6	44,4
	Sp (%)	50,0	65,6	93,8	93,8	0,0	7,1	85,7	92,9	87,5	87,5	57,1	64,3
	VPP (%)	40,7	42,1	71,4	33,3	33,3	35,0	71,4	75,0	50,0	33,3	45,5	44,4
	VPN (%)	72,7	70,0	71,4	65,2	0,0	33,3	75,0	68,4	68,3	65,1	66,7	64,3
	n	49	49	49	49	23	23	23	23	49	49	23	23
8 días	Se (%)	70,6	35,3	29,4	11,8	100,0	77,8	55,6	44,4	11,8	5,9	22,2	22,2
	Sp (%)	46,9	65,6	93,8	93,8	0,0	14,3	78,6	92,9	90,6	93,8	85,7	92,9
	VPP (%)	41,4	35,3	71,4	50,0	39,1	36,8	62,5	80,0	40,0	33,3	50,0	66,7
	VPN (%)	75,0	65,6	71,4	66,7	0,0	50,0	73,3	72,2	65,9	65,2	63,2	65,0
	n	49	49	49	49	23	23	23	23	49	49	23	23
10 días	Se (%)	70,6	47,1	29,4	11,8	100,0	66,7	55,6	44,4	11,8	5,9	22,2	22,2
	Sp (%)	37,5	71,9	93,8	93,8	0,0	28,6	78,6	92,9	96,9	96,9	92,9	92,9
	VPP (%)	37,5	47,1	71,4	50,0	39,1	37,5	62,5	80,0	66,7	50,0	66,7	66,7
	VPN (%)	70,6	71,9	71,4	66,7	0,0	57,1	73,3	72,2	67,4	66,0	65,0	65,0
	n	49	49	49	49	23	23	23	23	49	49	23	23
14 días	Se (%)	82,4	47,1	29,4	23,5	77,8	55,6	44,4	33,3	5,9	5,9	11,1	0,0
	Sp (%)	21,9	65,6	84,4	93,8	0,0	35,7	85,7	92,9	96,9	96,9	92,9	92,9
	VPP (%)	35,9	42,1	50,0	66,7	33,3	35,7	66,7	75,0	50,0	50,0	50,0	0,0
	VPN (%)	70,0	70,0	69,2	69,8	0,0	55,6	70,6	68,4	66,0	66,0	61,9	59,1
	n	49	49	49	49	23	23	23	23	49	49	23	23

*Consultar Materiales y Métodos para la definición de las reglas. Se: Sensibilidad. Sp: Especificidad. VPP: Valor Predictivo Positivo. VPN: Valor Predictivo Negativo. n: número de casos.

Tabla V.24. Resultados de Se, Sp, VPP y VPN al aplicar los algoritmos* a las medidas de CE del prototipo en el ordeño de la tarde, considerando 5 días post-infección conjuntamente.

Horizonte temporal		R1				R2				R3		R4	
		5%	10%	20%	30%	5%	10%	20%	30%	3σ	4σ	3σ	4σ
4 días	Se (%)	90,5	61,9	33,3	19,0	100,0	100,0	60,0	30,0	28,6	23,8	80,0	60,0
	Sp (%)	28,6	53,6	89,3	96,4	7,7	23,1	61,5	69,2	89,3	92,9	30,8	69,2
	VPP (%)	48,7	50,0	70,0	80,0	45,5	50,0	54,5	42,9	66,7	71,4	47,1	60,0
	VPN (%)	80,0	65,2	64,1	61,4	100,0	100,0	66,7	56,3	62,5	61,9	66,7	69,2
	n	49,0	49,0	49,0	49,0	23,0	23,0	23,0	23,0	49,0	49,0	23,0	23,0
8 días	Se (%)	90,5	66,7	33,3	19,0	100,0	100,0	60,0	30,0	19,0	19,0	50,0	40,0
	Sp (%)	21,4	46,4	92,9	96,4	0,0	30,8	69,2	69,2	100,0	100,0	61,5	92,3
	VPP (%)	46,3	48,3	77,8	80,0	43,5	52,6	60,0	42,9	100,0	100,0	50,0	80,0
	VPN (%)	75,0	65,0	65,0	61,4	0,0	100,0	69,2	56,3	62,2	62,2	61,5	66,7
	n	49,0	49,0	49,0	49,0	23,0	23,0	23,0	23,0	49,0	49,0	23,0	23,0
10 días	Se (%)	90,5	57,1	38,1	19,0	100,0	100,0	50,0	30,0	19,0	19,0	40,0	30,0
	Sp (%)	17,9	53,6	85,7	96,4	0,0	30,8	69,2	69,2	100,0	100,0	76,9	92,3
	VPP (%)	45,2	48,0	66,7	80,0	43,5	52,6	55,6	42,9	100,0	100,0	57,1	75,0
	VPN (%)	71,4	62,5	64,9	61,4	0,0	100,0	64,3	56,3	62,2	62,2	62,5	63,2
	n	49,0	49,0	49,0	49,0	23,0	23,0	23,0	23,0	49,0	49,0	23,0	23,0
14 días	Se (%)	95,2	95,2	42,9	28,6	100,0	100,0	50,0	30,0	14,3	9,5	40,0	10,0
	Sp (%)	10,7	21,4	67,9	85,7	0,0	15,4	61,5	69,2	96,4	100,0	76,9	100,0
	VPP (%)	44,4	47,6	50,0	60,0	43,5	47,6	50,0	42,9	75,0	100,0	57,1	100,0
	VPN (%)	75,0	85,7	61,3	61,5	0,0	100,0	61,5	56,3	60,0	59,6	62,5	59,1
	n	49,0	49,0	49,0	49,0	23,0	23,0	23,0	23,0	49,0	49,0	23,0	23,0

*Consultar Materiales y Métodos para la definición de las reglas. Se: Sensibilidad. Sp: Especificidad. VPP: Valor Predictivo Positivo. VPN: Valor Predictivo Negativo. n: número de casos.

4. **DISCUSIÓN.**

La incidencia y prevalencia de la infección intramamaria fue muy elevada (46,15% en ovejas y 42,87% en glándulas), comparada con la bibliografía consultada, en la que los valores de prevalencia oscilan entre un 5% publicado en la revisión de Contreras *et al.* (2007), pasando por 10,4% (Al-Majali y Jawabreh, 2003) y 39,9% (Leitner *et al.*, 2001) a nivel de glándula y un 15% (Mc Dougall *et al.*, 2003) y un 32% (Leitner *et al.*, 2003) a nivel de individuo. Fue también superior a lo observado en el Ensayo 1, donde se obtuvo una incidencia de la infección del 18,75% y 9,52% en ovejas multíparas y primíparas, respectivamente, en el primer año y del 18,33% en el segundo año. La alta incidencia de la infección en este experimento es debida al propio diseño experimental. Las diversas SDS practicadas aumentaron la probabilidad de que las glándulas adquirieran una infección intramamaria al quedar expuestos los pezones a prácticas de ordeño y/o manejo consideradas como "de riesgo" para la transmisión cruzada de mamitis. Todas las infecciones cursaron de forma subclínica probablemente debido a que desde el inicio de las SDS se realizaron cultivos bacteriológicos y se analizó el RCS de forma diaria, por lo que en el momento que aparecía la infección intramamaria y antes de que se observaran síntomas clínicos las glándulas infectadas dejaban de someterse a SDS.

El efecto significativo del ordeño (mañana o tarde) en las variables fue debido al diferente intervalo entre ordeños, transcurriendo 8 h desde el ordeño de la mañana a la tarde y 16 horas desde el ordeño de la tarde a la mañana siguiente. La mayor producción en el ordeño de la mañana genera un efecto dilución que provoca que el RCS sea menor, de acuerdo a lo observado por Arias *et al.* (2012) también en ovejas Manchegas, y Santos *et al.* (2007). Este efecto también puede darse en los distintos componentes de la leche, afectando a su composición dando lugar a variaciones de la CE, lo cual ha sido observado también en ganado vacuno (Fernando *et al.*, 1985; Hillerton y Walton, 1991) y en ovino por McKusick *et al.* (2002) quienes observaron un incremento de la grasa en el ordeño de la tarde.

En las glándulas infectadas pertenecientes a ovejas infectadas de forma unilateral no se observó ninguna variación significativa de la CE, de forma similar a lo observado en ganado caprino por Díaz *et al.* (2012), quienes lo atribuyeron a que para que la CE aumente, la infección debe provocar daños suficientes en los tejidos que modifiquen la permeabilidad de sales hacia el lumen alveolar, siendo uno de los principales factores del

incremento de la CE en la leche, de acuerdo con Linzell *et al.* (1974). En este ensayo los resultados del estudio de regresión de la CE con la composición de la leche indican que son la lactosa y caseínas los responsables mayoritarios de las variaciones de CE ($R^2_{\text{parcial}}=0,81$). Ambos componentes son sintetizados por los lactocitos, por lo que daños en los mismos causarían descenso de dichos componentes (Shuster *et al.*, 1991), los cuales tienen una relación negativa con la CE. Así, es necesario que el daño causado sea suficiente para causar variaciones en la composición que modifique la CE.

La instauración de la infección bilateral provocó un incremento significativo de la CE de acuerdo con lo observado en diversos trabajos en ganado vacuno (Fernando *et al.*, 1982; Bruckmaier *et al.*, 2004; Holdaway, 2006), en ganado caprino (Ying *et al.*, 2004; Díaz *et al.*, 2012 y en ganado ovino (Peris *et al.*, 1989, 1991). En el ordeño de la mañana, la CE se incrementó de forma significativa en el primer periodo tras la instauración de la infección (1-3 días), aunque el valor máximo de CE (4,41 mS/cm) no se alcanzó hasta el segundo periodo desde la instauración de la infección (4-7 días). En el ordeño de la tarde, el valor máximo (4,26 mS/cm) se alcanzó inmediatamente después de la instauración de la infección. Estos valores son inferiores a los medidos por Peris *et al.* (1989) quienes observaron una CE de 4,40 mS/cm en ovejas de raza Manchega libres de infección intramamaria, alcanzando valores entre 5,04 mS/cm y 10,28 mS/cm en glándulas infectadas por *S. epidermidis* y *S. aureus*, respectivamente. También en ganado ovino, Barth *et al.* (2008) obtuvieron mayor CE ($5,0 \pm 0,56$ mS/cm) que los medidos en este experimento, observando además una alta variabilidad en la CE, que la atribuyeron a las variaciones del contenido graso de la leche. En estudios más recientes, Caria *et al.* (2016) registraron una CE media global en ovejas de raza Sarda de $4,73 \pm 0,54$ mS/cm, con una CE de 5,20 mS/cm cuando el RCS era superior a 700×10^3 cel/mL (umbral que utilizaron para la clasificación de mamitis), y de 4,63 mS/cm en ovejas con RCS inferior al mencionado umbral. En el mismo trabajo, proponen un umbral de 4,835 mS/cm para diferenciar entre glándulas sanas e infectadas, con el que obtuvieron un 73,08 y un 75,46% de Se y Sp, respectivamente. Este umbral es superior al valor máximo de CE registrado en este ensayo, lo que corrobora la necesidad de tener en cuenta otros factores que afectan a la CE además de la mamitis (raza, estado de lactación, número de parto...), por lo que no sería válido un mismo umbral absoluto de CE para la detección de mamitis en todo el ovino lechero, de acuerdo también con lo observado en el Ensayo 1 de esta Tesis.

El efecto significativo de la instauración de la infección sobre animales infectados bilateralmente sugiere que el empleo de sistemas de detección de mamitis basados en lecturas diarias de CE podría detectar incrementos de la variable, y con ello, la enfermedad en las glándulas afectadas de forma bilateral. En cambio, en los animales en los que la infección se instauró de forma unilateral, al no producirse cambios significativos en la CE, la enfermedad no sería detectada.

Respecto a la producción, se registró una oscilación durante los periodos previos al día de referencia de instauración de la infección tanto en las glándulas de ovejas que permanecieron libres de infección e infectadas unilateralmente, por lo que el descenso observado en el periodo inmediatamente posterior a la instauración de la infección parece ser una continuación de las fluctuaciones normales que pueden estar afectadas por otros factores, de modo similar a lo observado por Díaz *et al.* (2012) en ganado caprino. En este trabajo no se observó que la infección unilateral provocase un descenso de la producción de la glándula infectada, ni un incremento compensatorio en la glándula colateral, lo que contradice a lo observado anteriormente en ganado ovino manchego por Martí de Olives *et al.* (2013) y Rovai *et al.*, (2015), quienes obtuvieron un descenso de la producción en glándulas infectadas cercano al 50% tanto en ovejas Manchegas como Lacaune.

En las glándulas de ovejas infectadas bilateralmente sí se dio un descenso de la producción en ambos ordeños en el primer periodo tras la instauración de la infección, bajando de los niveles registrados en los periodos anteriores a la instauración de la infección. Este descenso fue de 21,41 y del 19,44% en el ordeño de la mañana y de la tarde, respectivamente, superior a lo observado por Gonzalo *et al.* (2002), quienes cuantificaron las pérdidas de producción por una infección bilateral causada por patógenos mayores en un 10%, mientras que en las unilaterales registraron un descenso del 8,75%. En el caso de ganado vacuno, los resultados son similares a los encontrados por Secchiari *et al.* (1999). La mayoría de las mamitis bilaterales fueron provocadas por patógenos mayores, aislándose enterobacterias en un 77,78 % de las ovejas. Es un porcentaje muy elevado comparado con el que obtuvo Gonzalo *et al.*, (2002), quienes solo encontraron enterobacterias en el 2,07% de los aislamientos realizados. Sin embargo, Albenzio *et al.* (2002), aislaron *E. coli* en un 41,9% de los casos de mamitis encontrados en 380 ovejas Comisana y la achacaron a una falta de higiene y la exposición de las ovejas a un ambiente y un manejo estresante. La alta prevalencia obtenida en este ensayo puede ser debida a la supresión del sellado de las glándulas tras el ordeño durante las SDS, con lo que los

animales quedaban expuestos a la entrada de este tipo de microorganismos, ya que son considerados ambientales, y causan infección por el contacto del animal con la cama u otros objetos contaminados. La disminución de la producción, aunque no significativa, fue menor en las mamitis causadas por patógenos ambientales (15%), que cuando se aislaron estafilococos coagulasa negativos (22%).

Los valores de RCS tanto en glándulas sanas como en las infectadas, son superiores a los que obtuvieron Martí *et al.* (2013) en ganado ovino Manchego. Con el progreso del experimento se observó un incremento significativo del RCS en las glándulas infectadas, especialmente en el primer periodo tras el establecimiento de la infección, lo cual está de acuerdo con la bibliografía consultada (Leitner *et al.*, 2001; Gonzalo *et al.*, 2002; Mc Dougall *et al.*, 2002 y Santos, 2007). También se observó un incremento significativo en las glándulas sanas, pero de escasa magnitud (menos de 100.000 cel/mL), mientras que en las infectadas se multiplicó por diez el valor previo a la infección.

La correlación del RCS y CE fue significativa, aunque moderada, en ambos ordeños, siendo mayor en el intervalo de altos recuentos ($RCS > 400.000$ cel /mL), lo que nos indica que la CE puede ser un indicador del estado sanitario de las glándulas, de acuerdo con lo publicado en ganado vacuno (Bruckmaier *et al.*, 2004; Yildiz *et al.*, 2006). Díaz *et al.* (2012) obtuvieron también una correlación positiva y significativa entre la CE y el RCS, siendo esta mayor para $RCS > 2.000 \times 10^3$ cel/mL (el mayor intervalo estudiado).

Al aplicar distintos algoritmos de cálculo para la detección de mamitis mediante la medida diaria de la CE en los cinco días posteriores a la instauración de la infección tratados de forma separada, se obtuvieron valores moderados de Se. Los casos en los que se obtuvo una elevada Se, fueron acompañados por baja Sp, es decir se estarían dando muchas falsas alarmas, que se traducirían en tratamientos innecesarios a animales sanos, o la necesidad de utilizar un método complementario a los sensores de CE para confirmar la enfermedad.

Al considerar en conjunto los cinco días posteriores a la infección, sí se registran valores altos de Se y de Sp en el ordeño de la mañana. Aplicando la R4, que emplea la relación de CE entre glándulas colaterales (RELEC) y el umbral de 3σ , con un horizonte temporal de 10 días, tanto la Se como la Sp, VPP y VPN fueron superiores al 90%. Con la misma regla, considerando los cinco días por separado se obtuvo solamente un 22,7% de Se.

En cuanto a los valores obtenidos al aplicar las distintas reglas a las medidas de CE tomadas por el prototipo, aunque en algunos casos la Se mejora con respecto a la obtenida con el conductímetro de referencia, también hay un descenso del VPP. Esto puede deberse al descalibrado que sufre el prototipo a lo largo del experimento. Sus registros de CE son cada día mayores que los obtenidos con el de referencia, este incremento paulatino de las medidas, se traduce en un incremento de los FP y mucho menor VPP, que se atribuye al observado.

5. CONCLUSIONES.

- El establecimiento de una infección intramamaria produjo un incremento del RCS y una disminución significativa de la producción, más acusada en ovejas infectadas bilateralmente que unilateralmente. La media de CE tras la instauración de la infección solo se elevó de forma significativa cuando la infección se produjo de forma bilateral.
- La lactosa y la caseína fueron las responsables en mayor medida de las variaciones de la CE con una R^2_{parcial} de 0,43 y 0,38, respectivamente, estando el contenido de ambas inversamente relacionado con la CE.
- La medida diaria de la CE puede ser una buena herramienta para la detección de mamitis si se utilizan los algoritmos adecuados. Las reglas basadas en la detección de variaciones anómalas de la RELCE han presentado mejores resultados que las basadas en variaciones de la CE. Aplicando la R4 con un umbral de 3σ , y teniendo en cuenta un horizonte temporal de 10 días, tanto la Se como la Sp, VPP y VPN fueron superiores al 90% al tener en cuenta el conjunto de los cinco días posteriores al establecimiento de la infección.
- Se han observado variaciones en cuanto al funcionamiento de las distintas reglas aplicadas en función del ordeño, de forma general, las reglas basadas en desviaciones respecto a la media móvil (R1 y R2) han funcionado mejor en el ordeño de la mañana. Y las basadas en desviaciones sobre la desviación típica (R3 y R4) han presentado un mejor comportamiento en el ordeño de la tarde.
 - A pesar de que con los datos registrados por el prototipo también se han obtenido altas Se y Sp, los VPP y VPN han sido inferiores, atribuyéndose a la descalibración del equipo observada a lo largo del experimento. Por ello, es necesario que en el desarrollo de equipos para la medida on-line de la CE se integren métodos de autocalibración.

VI. CONCLUSIONES



VI. CONCLUSIONES GENERALES.

Las principales conclusiones que pueden obtenerse a partir de los resultados de los experimentos que se recogen en esta Tesis Doctoral son los siguientes:

- A. La CE de la leche varía en función del estado sanitario de las glándulas, pero también se producen variaciones a causa de distintos factores no infecciosos. La CE varía a lo largo de la lactación, siendo al inicio superior a la registrada en el resto de lactación. Se observa la misma evolución de la variable independiente del número de parto, pero la CE de las ovejas primíparas es inferior a la de las multíparas. La sesión de ordeño también tiene un efecto significativo en la CE, siendo menor la medida en el ordeño de la tarde. Y por último, también se observan diferencias en la CE de la leche de una misma glándula en función de la fracción de ordeño en la que se mida, siendo inferior en la leche de apurado que en la leche máquina y esta, a su vez, es menor que la de los primeros chorros.
- B. En glándulas con mamitis infecciosa, la CE fue significativamente superior a la registrada en las glándulas sanas o con infección latente en ovejas primíparas y multíparas, aunque solo se observaron diferencias entre la CE de glándulas sanas o con infección latente en animales primíparos. En las glándulas con mamitis infecciosa, la CE de las tres fracciones estudiadas sigue una evolución similar a la de las glándulas sanas (disminuye a medida que avanza el ordeño), pero en este caso no se observan diferencias significativas entre la leche máquina y la leche de apurado.
- C. El establecimiento de la infección intramamaria solo provocó una elevación significativa de la CE en las glándulas de las ovejas que se infectaron de forma bilateral.
- D. En los tres experimentos se observó que algunos componentes de la leche explican en gran medida los cambios que se producen en la CE, por lo que cualquier efecto que haga que esta varíe, provocará cambios en la CE. Por tanto, la CE es un método válido para la detección de mamitis siempre y cuando la infección llegue a provocar daños en la glándula mamaria capaces de alterar la composición de la leche.

- E. Hay una correlación significativa pero moderada entre la CE de la leche y el RCS, siendo ésta mayor cuando se eleva el RCS por encima de 400.000 cel/mL.
- F. Debido a que la CE varía en función de distintos factores no infecciosos, el establecimiento de un umbral absoluto de CE para la clasificación de las glándulas en función de su estado sanitario no logra resultados óptimos. De esta forma, para un mismo umbral de CE, la Se, Sp, VPP y VPN variaron en función del número de parto, el tipo de ordeño (mañana o tarde) o la fracción de leche.
- G. Para minimizar el efecto de los factores no infecciosos en la capacidad de detección de mamitis de la CE de la leche, es recomendable el uso de algoritmos de cálculo basados en la comparación de la CE con medidas previas de la CE de una misma glándula que permitan detectar variaciones anómalas de la variable, con los que se han obtenido resultados satisfactorios en esta Tesis. El mejor resultado se ha obtenido al aplicar la regla basada en la detección de una desviación de la RELCE de tres veces la desviación típica con respecto a la media de RELCE de los registros tomados durante los 10 días anteriores ($3\sigma > RELCE - RELCE_{med(10 \text{ días previos})} > 3\sigma$), al tener en cuenta el conjunto de los 5 días posteriores a la instauración de la infección.
- H. Para una correcta medida de la CE “on-line” durante el ordeño, serían necesarios más estudios enfocados al diseño de sensores de menor tamaño que puedan de ser integrados en el tubo corto de leche o en la pezonera, dotados un sistema de autocalibración, cuidando en todo momento que su fabricación sea a base de materiales autorizados para su uso en la industria agroalimentaria y que no se vean afectados por los detergentes utilizados en el lavado diario de las máquinas de ordeño.

**VII. REFERENCIAS
BIBLIOGRÁFICAS.**



- Addis, M.F.; Tedde, V.; Dore, S.; Pisanu, S.; Puggioni, G.M.G.; Roggio, A.M.; Pagnozzi, D.; Lollai, S.; Cannas, E.A.; Uzzau, S. 2016. Evaluation of milk cathelicidin for detection of dairy sheep mastitis. *Journal of Dairy Science*. 99:6446-6456. <http://dx.doi.org/10.3168/jds.2015-10293>
- Albenzio, M.; Taibil, L.; Muscio, A.; Sevi, A. 2002. Prevalence and etiology of subclinical mastitis in intensively managed flocks and related changes in the yield and quality of ewe milk. *Small Ruminants Research*. 43:219-226.
- Al-Majali, A.M.; Jawabreh, S. 2003. Period prevalence and etiology of subclinical mastitis in Awassi sheep in southern Jordan. *Small Ruminant Research*. 47:243-248.
- Ankinakatte, S.; Norberg, E.; Løvendahl, P.; Edwards, S.; Højsgaard, S. 2013. Predicting mastitis in dairy cows using neural networks and generalized additive models: A comparison. *Computers and Electronics in Agriculture* 99:1-6.
- Antonič, J.; Jackuliaková, L.; Uhrinča, M.; Mačuhová, L.; Oravcová, M.; Tančin, V. 2013. Changes in milk yield and composition after lamb weaning and start of machine milking in dairy ewes. *Slovak Journal Animal Science*. 46 (3): 93-99.
- AOAC International. 1995. *Official Methods of Analysis*. Vol. 2. 16th ed. Capítulo 33. AOAC International, Arlington. VA.
- Arias, R.; Oliete, B.; Ramón, M.; Arias, C.; Gallego, R.; Montoro, V.; Gonzalo, C.; Pérez-Guzmán, M.D. 2012. Long-term of environmental effects on test-day somatic cell count and milk yield in Manchega sheep. *Small Ruminant Research*. 106:92-97.
- Arias, R.; Gallego, R.; Altares, S.; Garzón, A.; Romero, J.; Jiménez, L.; Oliete, B.; Arias, C.; Caballero, J.; Martínez, A.; Núñez, N.; García, A.; Ramón, M.; Montoro, V.; Pérez-Guzmán, M.D. 2016. Calidad de la leche en ganaderías de ovino Manchego. Revisión. *Arch. Zootec*. 65 (251): 469-473.
- Ariznabarreta, A.; C. Gonzalo,; San Primitivo, F. 2002. Microbiological quality and somatic cell count of ewe milk with special reference to staphylococci. *Journal Dairy Science*. 85:1370–1375.
- Babaei, H.; Mansouri-Najand, L.; Molaei, M.M.; Kheradmand, A.; Sharifan, M. 2007. Assessment of Lactate Dehydrogenase, Alkaline Phosphatase and Aspartate Aminotransferase Activities in Cow's Milk as an Indicator of Subclinical Mastitis. *Veterinary Research Communications*. 31:419-425.
- Bansal, B.K.; Hamann, J.; Grabowski, N.T.; Singh, K.B. 2005. Variation in the composition of selected milk fraction samples from healthy and mastitic quarters, and its significance for mastitis diagnosis. *Journal Dairy Research*. 72:144–152
- Bareille, N.; Beaudeau, F.; Billon, S.; Robert, A.; Faverdin, P. 2003. Effects of health disorders on feed intake and milk production in dairy cows. *Livest Prod Sci*. 83:53–62.

- Barkema, H.W.; Schukken, Y.H.; Lam, T.J.G.M.; Galligan, D.T.; Beiboer, M.L.; Brand, A. 1997. Estimation of interdependence among quarters of the bovine udder with subclinical mastitis and implications for analysis. *Journal of Dairy Sci.* 80:1592–1599.
- Barros, G.C.; Leitao, C.H.S. 1992. Influencia da mastitis sobre as características físico-químicas do leite de cabra. *Pesquisa Veterinaria Brasileira.* 12(3/4):45-48.
- Barth, K.; Worstorff, H. 2000. Influence of different milking intervals on electrical conductivity before alveolar milk ejection in cows. *Milchwissenschaft.* 55(7): 363-365.
- Barth, K.; Worstorff, H. 2000. Influence of different milking intervals on electrical conductivity before alveolar milk ejection in cows. *Milchwissenschaft.* 55(7): 363-365.
- Barth, K.; Burow, E.; Knappstein, K.; Ubben, E.H. 2007. Measurement of electrical conductivity to monitor udder health in ewes. In: *Proceedings of 9th German Scientific Conference on Organic Agriculture-Between Tradition and Globalization*, Hohenheim, Germany, 20-22 March 2007.
- Barth, K.; Burow, E.; Knappstein, K. 2008. EC and CMT detect subclinical mastitis in dairy sheep but less sensitive than in dairy cows. *Landbauforschung Volkenrode* 58:65-69.
- Batavani, P.A.; Mortaz, J.; Falahian, K.; Daowoodi, M.A. 2003. Study on frequency, etiology and some enzymatic activities of subclinical ovine mastitis in Urmi, Iran. *Small Ruminants Research.* 50:45-50
- Bedö, S.; Nikodémusz, E.; Gundel, K. 1995. Variations in the yield, composition and somatic cell count of ewe's milk during lactation. *Acta Veterinaria Hungarica.* 43:463-473.
- Berning, L.M y Shook, G.E. 1992. Prediction of mastitis using milk somatic cell count, N-acetyl-B-D-glucosaminidase and lactose. *Journal Dairy Science.* 75:1840-1848.
- Bianchi, L.; Bolla, A.; Budelli, E.; Caroli, A.; Casoli, C.; Pauselli, M.; Duranti, E.; 2004. Effect of Udder Health Status and Lactation Phase on the Characteristics of Sardinian Ewe Milk. *Journal Dairy Science.* 87:2401–2408.
- Biggadike, H.J.; Ohnstad, I.; Laven, R.A.; Hillerton, J.E. 2002. Evaluation of measurement of the conductivity of quarter milk samples for the early diagnosis of mastitis. *The Veterinary Record.* 150: 655-658.
- Blood, D. C.; Radostis, O. M.; Arundel, J. H.; Gay, C.C. 1992. *Medicina Veterinaria: libro de texto de las enfermedades de ganado vacuno, ovino, porcino, caprino y equino.* 7ª ed. Interamericana McGraw-Hill. ISBN: 8476158564.
- Bruckmaier, R. M.; Ontsouka, C. E.; Blum, J. W. 2004a. Fractionized milk composition in dairy cows with subclinical mastitis. *Vet. Med. – Czech.* 49:283–290.

- Bruckmaier, R. M., D. Weiss, M. Wiedemann, S. Schmitz, and G. Wendl. 2004b. Changes of physicochemical indicators during mastitis and the effects of milk ejection on their sensitivity. *Journal Dairy Research*. 71:316–321.
- Burriel, A. R. 1997. Dynamics of intramammary infection in the sheep caused by coagulase-negative staphylococci and its influence on udder tissue and milk composition. *Vet. Rec.* 140:419–423.
- Burriel, A. R. and Wagstaff, A. 1998. The influence of ewe intramammary infection caused by coagulase-negative staphylococci on the milk constituents total protein, albumin, potassium and sodium. *Animal Science*. 67:499–502.
- Caria, M.; Chessa, G.; Murgia, L.; Todde, G.; Pazzona, A. 2016. Development and test of a portable device to monitor the health status of Sarda breed sheep by the measurement of the milk electrical conductivity. *Italian Journal of Animal Science*. 15:2, 275-282.
- Castillo, V.; Such, G.; Caja, G.; Casals, R.; Albanell, E.; Salama, A.A.K. 2008. Effect of milking interval on milk secretion and mammary tight junction permeability in dairy ewes. *Journal Dairy Science*. 91: 2610-2619.
- Cavero, D.; Tölle, K.-H.; Buxadé, C.; Krieter, J. 2006. Mastitis detection in dairy cows by application of fuzzy logic. *Livestock Science*. 105:207–213.
- Cavero, D.; Tölle, K.H.; Rave, G.; Buxadé, C.; Krieter, J. 2007. Analyzing serial data for mastitis detection by means of local regression. *Livestock Science*. 110:101–110.
- Cavero, D.; Tölle, K.-H.; Henze, C.; Buxadé, C.; Krieter, J. 2008. Mastitis detection in dairy cows by application of neural networks. *Livestock Science*. 114 (2008) 280–286.
- Clements, A.C.A.; Taylor, D.J.; Fitzpatrick, D.J. 2003. Evaluation of diagnostic procedures for subclinical mastitis in meat-producing sheep. *Journal Dairy Research*. 70:139–148.
- Contreras, A.; Sánchez, A.; Corrales, J.C.; Luengo, C; Marco, J. 1997. Concepto e importancia de las mamitis caprinas. *Ovis*. 53:11-31.
- Contreras, A.; Sierra, D.; Corrales, J.C.; Marco, J.C.; Paape, M.J.; Gonzalo, C. 2007. Mastitis in small ruminants. *Small Ruminant Research*. 68:145-153.
- Das, M.; Sing, M. 2000. Variation in blood leucocytes, somatic cell count, yields and composition of milk of crossbred goats. *Small Ruminants Research*. 35:169-174.
- De Garnica, M.L.; Linage, B.; Carriedo, J.A.; Santos, J.A.; Gonzalo, C. 2013. *Escherichia coli* prevalence in ovine bulk tank milk. *Small Ruminant Research*. 115: 108-112.
- De la Cruz, M.; Serrano, E.; Montoro, V.; Marco, J.; Romeo, M.; Baselga, R.; Albizu, I.; Amorena, B. 1994. Etiology and prevalence of subclinical mastitis in the Manchega sheep at mid-late lactation. *Small Ruminant Research*. 14, 175-180.

- De Mol, R. M.; Keen, A.; Kroeze, G. H.; Achten, J.M.F.H. 1999. Description of a detection model for oestrus and diseases in dairy cattle based on time series analysis combined with a Kalman filter. *Comput. Electron. Agric.* 22:171–185.
- De Mol, R.M.; Ouweltjes, W. 2002. Modelo de detección de mastitis en vacas ordeñadas en un sistema automático de ordeño. *Ordeño Robotizado*. Pp: 103-113. Coord.: Caja, G.; López, J. Ed.: Agrícola Española Madrid.
- DeLaval Cell Counter DCC, <http://www.delaval-us.com/Products/Milking/Cell-counter-DCC/DCC/default.htm>
- Dhakal, I.P.; Neupane, M. & Nagahata, H. 2008. Evaluation of direct and indirect measures of quarter milk from crossbred buffaloes. *Animal Science Journal*. 79:628-633.
- Díaz, J.R.; Muelas, R.; Segura, C.; Peris, C.; Molina, P. 1996. Effect of mastitis on milk composition in Manchega ewes: Preliminary results. *Somatic Cells and Milk of Small Ruminants*. EAAP Publication, Wageningen Pers., Wageningen, the Netherlands; 1996 (Pages 305–309).
- Díaz, J.R.; Muelas, R.; Santini, Z; Alsina, D.; Romero, G.; Sendra, E.; Peris, C. 2003. Contenido de cloruros en leche de cabra en condiciones fisiológicas. Estudio de los electrodos selectivos como método de determinación. XXVIII Jornadas Científicas y VII Internacionales de la SEOC. Badajoz. *Producción ovina y caprina*. 28:89-92.
- Díaz, J.R., Romero, G., Muelas, R., Sendra, E., Pantoja, J.C.F., Paredes, C. 2011. Analysis of the influence of variation factors on electrical conductivity of milk in Murciano-Granadina goats. *Journal Dairy Science*. 94:3385-3394.
- Díaz, J.R.; Romero, G.; Muelas, R.; Alejandro, M.; Peris, C. 2012. Effect of intramammary infection on milk electrical conductivity in Murciano-Granadina goats. *Journal Dairy Science*. 95: 718-726. doi:10.3168/jds.2011-4698.
- Dohoo, I.R.; Smith, J.; Andersen, S.; Kelton, D.F.; Godden, S.; 2011. Diagnosing intramammary infections: Evaluation of definitions based on a single milk sample. *Journal of Dairy Science*. 94: 250–261.
- El Zubeir, I.E.M.; Elowni, O.A.O.; Ohamed, G.E. 2005. Effect of mastitis on macro-minerals of bovine milk and blood serum in Sudan. *J.S.Afr.Vet.Ass.* 76 (1): 22-25.
- El-Saied, U.M.; Carriedo, J.A.; San Primitivo, F. 1998. Heritability of test day somatic cell count and its relationship with milk yield and protein percentage in dairy ewes. *Journal of Dairy Science*. 81: 2956-2961.
- Ergün, Y.; Aslantaş, Ö.; Doğruer, G.; Kireççi, E.; Sarıbay, M. K.; Ateş, C.T.; Ülkü, A.; Demir, C. 2009. Prevalence and etiology of subclinical mastitis in Awassi dairy ewes in southern Turkey. *Turk. J. Vet. Anim. Sci.* 33(6): 477-483. doi:10.3906/vet-0803-23.

- Fernandes, M.A. 2002. Avaliação das características físico-químicas, celulares e microbiológicas do leite de cabras, das raças Saanen e Alpina, criadas no estado de Sao Paulo. Tesis Doctoral. 152pp. Sao Paulo. Brasil.
- Fernando, R.S.; Spahr, S.; Jaster, E.H. 1985. Comparison of electrical conductivity of milk with other indirect methods for detection of subclinical mastitis. *Journal Dairy Science*. 68: 449-456.
- Ferrero, F.J.; Valledor, M.; Campo, J.C. 2014. Screening method for early detection of mastitis in cows. *Measurement*. 47:855-860. DOI: 10.1016/j.measurement.2013.10.015.
- Fosgate, G.T.; Petzer, I.M.; Karzis, J. 2013. Sensitivity and specificity of a hand-held milk electrical conductivity meter compared to the California mastitis test for mastitis in dairy cattle. *The Veterinary Journal*. 196:98–102.
- Fox, L. K.; Shook, G. E.; Schultz, L. H. 1985. Factors related to milk loss in quarters with low somatic cell counts. *Journal Dairy Science*. 68, 2100-7.
- Fox, P. and Kelly, A. 2006. Indigenous enzymes in milk: Overview and historical aspects—Part 1, *International Dairy Journal* 16: 500–516.
- Fragkou, I.A.; Solomakos, N.; Dagleish, M.P.; Cripps, P.J.; Papaioannou, N.; Boscos, C.M.; Ververidis, H.N.; Bilinis, C.; Orfanou, D.C.; Govaris, A.; Kyriaskis, I.; Fthenakis, G.C. 2008. Effects of experimental challenge of ewes with *Mannheimia haemolytica* on subsequent milk composition. *Journal of Dairy Research*. 75: 340-346.
- Friedman, N.; Geiger, D.; Goldszmidt, M. 1997. Bayesian network classifiers. *Mach. Learn*. 29:131–163.
- Fuertes, J.A.; Gonzalo, C.; Carriedo, J.A.; San Primitivo, F. 1998. Parameters of test day milk yield and milk components for dairy ewes. *Journal Dairy Science*. 81, 1300:1307.
- Gajdusek, S.; Jelinek, P.; Hampl, A. 1996. Somatic cell counts in goat milk and their relation to milk composition and properties. *Zivocisna Vyroba*. 41 (1): 25-31.
- Gebrewahid, T.T.; Abera, B.H.; Menghistu, H.T. 2012. Prevalence and Etiology of Subclinical Mastitis in Small Ruminants of Tigray Regional State, North Ethiopia. *Vet. World* 5 (2): 103-109. doi: 10.5455/vetworld.2012.103-109.
- Gonzalo, C.; Carriedo, J.A.; Baro, J.A.; San Primitivo, F. 1994. Factors influencing variation of test day milk yield, somatic cell counts, fat and protein in dairy sheep. *Journal Dairy Science*. 77: 1537-1542.
- Gonzalo, C.; Ariznabarreta, A.; Tardégula, J.A.; San Primitivo, F. 1998. Factores infecciosos de variación del recuento celular de la leche de oveja. *Ovis* 56: 27-34.
- Gonzalo, C.; Ariznabarreta, A.; Carriedo J.A.; San Primitivo, F. 2002. Mammary pathogens and their relationship to somatic cell count and milk yield losses in dairy ewes. *Journal Dairy Science* 85:1460– 1467.

- Gonzalo, C.; Linage, B.; Carriedo, J.A.; De la Fuente, F.; San Primitivo, F. 2006. Evaluation of the Overall Accuracy of the DeLaval Cell Counter for Somatic Cell Counts in Ovine Milk. *Journal of Dairy Science*. 89:4613-4619.
- Grohn, Y.T.; Wilson, D.J.; Gonzalez, R.N.; Hertl, J.A.; Schulte, H.; Bennett, G.; Schukken, Y.H. 2004. Effect of pathogen-specific clinical mastitis on milk yield in dairy cows. *Journal Dairy Science*. 87:3358–3374.
- Guliye, A.Y.; Van Creveld, C.; Yagil, R. 2002. Detection of subclinical mastitis in dromedary camels (*Camelus dromedarius*) using Somatic cell counts and the N-acetyl- β -D- glucosaminidase test. *Tropical animal health and production*. 34: 95-104.
- Hagiwara, S.; Kawai, K.; Anri, A.; Nagahata, H. 2003. Lactoferrin concentrations in milk from normal and subclinical mastitic cows. *Journal Veterinary Medical Science*. 65, 319-323.
- Hagnestam, C.; Emanuelson, U.; Berglund, B. 2007. Yield losses associated with clinical mastitis occurring in different weeks of lactation. *Journal Dairy Science*. 90:2260–2270.
- Hamann, J., Zecconi, A. 1998. Evaluation of the electrical conductivity of milk as a mastitis indicator. *Bulletin of the IDF*. 334: 5-22.
- Hamed, A.I., Abou-Zeid, N. A., Keary, K.M.K., & Radwan, A.A., 1993. Physical and chemical properties of subclinical mastitic sheep's and goat's milk. *Egyptian Journal Dairy Science*. 21 (1): 133-149.
- Harmon, R.J.; Eberhart, D.E.; Jasper, E.; Langlois, E.; Wilson, R.A. 1990. *Microbiological Procedures for the diagnosis of Bovine Udder Infection*. National Mastitis Council, Arlington, VA.
- Hillerton, J.E.; Walton, A.W. 1991. Identification of subclinical mastitis with a hand-held electrical conductivity meter. *The veterinary Record*. 128: 513-515.
- Hogeveen, H.; Ouweltjes, W. 2002. Automatic on-line detection of abnormal milk. Pages 1735–1740 in *Encyclopedia of Dairy Science*. H. Roginski, J. W. Fuquay, and P. F. Fox, ed. Academic Press Inc., London, UK.
- Holdaway, R.J.; Holmes, C.W.; Steffert, I.J. 1996. A comparison of indirect methods for diagnosis of subclinical intramammary infection in lactating dairy cows. *The Australian Journal of Dairy Technology*. 51: 64-82.
- Holt, C. 1985. The milk slats: Their secretion, concentrations and physical chemistry. Pag 143-181 en *Developments in Dairy Chemistry*. P.F. Fox, ed. Elsevier Applied Science Publishers, London, UK.
- Hovinen, M.; Aisla, A.M.; Pyörälä, S. 2006. Accuracy and reliability of mastitis detection with electrical conductivity and milk colour measurement in automatic milking. *Acta Agric. Scand. A* 56:121-127.

- Janzekovic, M.; Brus, M.; Mursec, B.; Vinis, P.; Stajko, D.; Cus, F. 2009. Mastitis detection based on electric conductivity of milk. *Journal of Achievements in Materials and Manufacturing Engineering*. 34 (1): 39–46.
- Kalmus, P.; Simojoki, H.; Pyörälä, S.; Taponen, S.; Holopainen, J.; Orro, T. 2013. Milk haptoglobin, milk amyloid A, and *N*-Acetyl- β -D-glucosaminidase activity in bovines with naturally occurring clinical mastitis diagnoses with a quantitative PCR test. *Journal Dairy Science*. 96:3662-3670.
- Kamphuis, C.; Mollenhorst, H.; Heedterbeek, J.A.P.; Hogeveen, H. 2010. Detection of clinical mastitis with sensor data from automatic milking systems is improved by using decision-tree induction. *Journal Dairy Research*. 93:3616-3627.
- Kamphuis, C.; Pietersma, D.; Van der Tol, R.; Wiedemann, M.; Hogeveen, H. 2008. Using sensor data patterns from an automatic milking system to develop predictive variables for classifying clinical mastitis and abnormal milk. *Comput. Electron. Agric.* 62:169–181.
- Kang, D.H.; Dougherty, R.H.; Clark, S.; Costello, M. 2002. Catalase activity for rapid assessment of high level total mesophilic microbial load in milk. *Journal of Food Science*. 67: 1844-1846.
- Kaşıkçı, G.; Çetin Ö.; Bingöl E.B.; Gündüz M.C. 2012. Relations between electrical conductivity, somatic cell count, California mastitis test and some quality parameters in the diagnosis of subclinical mastitis in dairy cows. *Turk. J. Vet. Anim. Sci.* 2012; 36(1): 49-55.
- Kawai, K.; Hagiwara, S.; Anri, A.; Nagahata, H. 1999. Lactoferrin concentration in milk of bovine clinical mastitis. *Veterinary Research Communications*. 23: 391-398.
- Kitchen, B.J., 1981. Review of the progress of dairy science. Bovine mastitis, milk compositional changes and related diagnostic tests. *Journal of Dairy Research* 48, 167–188.
- Kitchen, B.J.; Middleton, G.; Salmon, M. 1978. Bovine milk *N*-acetyl- β -D-glucosaminidase and its significance in the detection of abnormal udder secretions. *Journal of Dairy Research*. 45: 15-20.
- Knudsen, K.; Jensen, N.E. 1990. The diagnosis of subclinical mastitis by redefinition of the interquarter variation using analysis of variance methods. *J. Dairy Research*. 57: 325-330.
- Lafi, S.Q. 2006. Use of cell counts and California Mastitis Test results from udder halves milk samples to detect subclinical intramammary infection in Awassi sheep. *Small Ruminant Research*. 62: 83–86.
- Lansberger, L.M.T.E.; Nelen, M.; Lam T.J.G.M.; Pengov, A.; Schukken, Y.H.; Maatje, K. 1994. Evaluation of a prototype on-line electrical conductivity system for detection of subclinical mastitis. *Journal Dairy Science*. 77: 1132-1140.

- Le Mens, P.; Dalmas, S.; Humbert, G. 1996. Relations entre l'activité de la N-acetylglucosaminidase (NAG-ase), le nombre de cellules, l'aptitude à la coagulation du lait et le statut infectieux mammaire chez la chèvre. Proceedings of the International Symposium on Somatic Cells and Milk of Small Ruminants, Bella, Italy. 25-9-1996. 311–312.
- Leitner, G.; Chaffer, M.; Zamir, S.; Mor, T.; Glickman, A.; Windler, M.; Weisblit, L.; Saran, A. 2001. Udder disease etiology, milk somatic cell counts and NAGase activity in Israeli Assaf sheep throughout lactation. *Small Ruminant Research*. 39: 107-112.
- Leitner, G.; Chaffer, M.; Caraso, Y.; Ezra, E.; Kababea, D.; Winkler, M.; Glickman, A.; Saran, A. 2003. Udder infection and milk somatic cell count, NAGase activity and milk composition – fat, protein and lactose – in Israeli-Assaf and Awassi sheep. *Small Ruminant Research* 49: 157–164.
- Leitner, G.; Chaffer, M.; Shamay, A.; Shapiro, F.; Merin, U.; Ezra, E.; Saran, A.; Silanikove, N. 2004. Changes in milk composition as affected by subclinical mastitis in sheep. *Journal of Dairy Science*. 87:46–52.
- Leitner, G.; Silanikove, N.; Merin, U. 2008. Short communication: Estimate of milk and curd yield loss of sheep and goats with intramammary infection and its relation to somatic cell count. *Small Ruminant Research*. 74:221–225.
- Leitner, G.; Merin, T.; Silanikove, N. 2011. Effects of glandular bacterial infection and stage of lactation on milk clotting parameters: Comparison among cows, goats and sheep. *International Dairy Journal*. 21, 279-285.
- Lien C.C.; Wan Y.N.; Chen, H.N. 2005. Performance evaluation of an online EC measurement system for dairy cow mastitis inspection. *Int. Agricultural Engineering*. J. 14 (2):89-99.
- Linzell, J.L.; Peaker, M. 1971. The permeability of mammary ducts. *Journal Physiology*. 216:701-716.
- Linzell, J.L.; Peaker, M.; Rowell, J.G., 1974. Electrical conductivity of foremilk for detecting subclinical mastitis in cows. *J. Agric. Sci.* 83: 309-325.
- Lucey, S.; Rowlands, G.J.; Russell, A.M. 1986. Short-term associations between disease and milk yield of dairy cows. *Journal Dairy Research*. 53:7–15
- Maatje, K.; De Mol, R.M.; Rossing, W. 1997. Cow status monitoring (health and Oestrus) using detection sensors. *Computers and Electronics in Agriculture*. 16:245-254.
- Maatje, K.; Huijsmans, P.J.M.; Rossing, W.; Hogewerf, P.H. 1992. The efficacy of in-line measurement of quarter milk electrical conductivity, milk yield and milk temperature for the detection of clinical and subclinical mastitis. *Livestock Production Science*. 30: 239-249.

- MAGRAMA, 2017. <http://www.magrama.gob.es/es/estadistica/temas/estadisticas-agrarias/ganaderia/encuestas-ganaderas/default.aspx#para4>
- Maisi, P. 1990. Milk NAGase, CMT and antitrypsin as indicators of caprine subclinical mastitis infections. *Small Ruminants Research*. 3:493-501.
- Mansell, P.D.; Seguya, A. 2003. The use of a hand-held conductivity meter for the diagnosis of subclinical mastitis in dairy cows during late lactation. *New Zealand Veterinary Journal*. 51: 21–25.
- Maron, S.H.; Prutton, C.F. 1972. *Principles of Physical Chemistry*, fourth ed., IBH Publishing, Oxford. pp. 423-425.
- Martí De Olives, A. 2005. Efecto de la mamitis subclínica y de las células somáticas sobre la producción y la calidad de la leche de oveja de Raza Manchega. Tesis Doctoral. Universidad Politécnica de Valencia.
- Martí De Olives, A.; Díaz, J. R.; Molina, M. P.; Peris, C. 2013. Quantification of milk yield and composition changes as affected by subclinical mastitis during the current lactation in sheep. *Journal Dairy Science*. 96:7698–7708.
- Martí, A.; Le Roux, L.; Laurent, F. 1999. Quality of protein in goat half-udder milk with varying somatic cell count levels. *Milking and milk production of dairy sheepa and goat*. (Ed: Barrillet, F y Zervas, N.P.). Wageningen Pers. EAAP. 95:543-546.
- Martí-De Olives, A.; Le Roux, Y.; Rubert-Alemán, J.; Peris, C.; Molina, M.P. 2011. Short communication: Effect of subclinical mastitis on proteolysis in ovine milk. *Journal Dairy Science*. 94:5369-5374.
- Martí-De Olives, A.; Navarro-Ríos, M.J.; Rubert-Alemán, J.; Fernández, N.; Molina, M.P. 2015. Composition, proteolysis indices and coagulating properties of ewe milk as affected by bulk tank somatic cell count. *Journal of Dairy Research*. 82:344-349.
- Martínez, B y Peris, C. 1998. Utilización del California Mastitis Test en el diagnóstico de mastitis caprinas y su relación con el Recuento de Células Somáticas. XXIII Jornadas Científicas de la Sociedad Española de Ovinotecnia y Caprinotecnia. (SEOC). País Vasco. pp. 375-379.
- Martins, R.F.S.; Paim, T.P.; Cardoso, C.A.; Dallago, B.S.L.; de Melo, C.B.; Louvandini, H.; McManus, C. 2013. Mastitis detection in sheep by infrared thermography. *Res. Vet. Sci*. 94:722–724.
- McDougall, S., Murdough, P., Pankey, W., Delaney, C., Barlow, J., Scruton, D., 2001. Relationship among somatic cell count California mastitis test, impedance and bacteriological status of milk in goats and sheep in early lactation. *Small Ruminant Res*. 40, 245–254.
- McDougall, S.; Pankey, W.; Delaney, C.; Barlow, J.; Murdough, P.A.; Scruton, D.; 2002. Prevalence and incidence of subclinical mastitis in goats and dairy ewes in Vermont, USA. *Small Rumin. Res*. 46, 115–121.

- McKusick, B.C.; Thomas, D.L.; Berger, Y.M.; Marnet, P.G. 2002. Effect of Milking Interval on alveolar versus cisternal milk accumulation and milk production and composition in dairy ewes. *J. Dairy Sci.* 85: 2197-2206.
- Mele, M.; Secchiari, P.; Serra, A.; Ferruzzi, G.; Paoletti, F.; Biagioni, M. 2001. Application of the “tracking signal” meted to the monitoring of udder health and Oestrus in dairy cows. *72*: 279-284.
- Merin, U.; Silanikove, N.; Shapiro, F.; Bernstein, S.; Leitner, G. 2004. Changes in milk composition as affected by subclinical mastitis in sheep and goats. *34 (supl 1)*: 188-191.
- Mólnar, A.; Kukovics, S. 1993. Relationship of the electric conductivity of sheep milk, the somatic cell count and the milk components. *Proceedings of the 5th international Symposium on machine milking of small ruminants. Budapest, Hungary. May 14-20. Pp 105-107.*
- Mollenhorst, H.; Rijkaart, L.J.; Hogeveen, H. 2012. Mastitis alert of framers milking with automatic milking systems. *Journal Dairy Science.* 95: 2523-2530.
- Morgan, F. 2000. Influencia de los recuentos de células somáticas sobre las cualidades tecnológicas de la leche de cabra y las características de los quesos. *Recuento de células somáticas en pequeños rumiantes II. Caprino. Ovis.* 67, 55-60.
- Mørk, T., Waage, S., Tollersrud, T., Kvitle, B., Sviland, S., 2007. Clinical mastitis in ewes; bacteriology, epidemiology and clinical features, *Acta Veterinaria Scandinavica*, 49 (23), 1–8.
- Moroni, P.; Cuccuru, C.; 2001. Relationship between mammary gland infections and some milk immune parameters in Sardinian breed ewes. *Small Ruminant Research.* 41: 1-7.
- Mottram, T.; Velasco-Garcia, M.; Berry, P.; Richards, P.; Ghesquiere, J.; and Masson, L. 2002. Automatic on-line analysis of milk constituents (urea, ketones, enzymes and hormones) using biosensors. *Comp. Clin. Pathol.* 11:50–58.
- Mucchetti, G.; Gatti, M.; Neviani, E. 1994. Electrical conductivity changes in milk caused by acidification: Determination factors. *Journal Dairy Science.* 77: 940-944.
- Muelas, R.; Molina, P.; Díaz, J.R.; Peris, C. 1996. Relationship between somatic cell counts, acidity and California mastitis test in manchega ewe milk. *Somatic cells and milk small ruminants.* Pp: 239-244.
- Munro, G.L.; P.A. Grieve.; B.J. Kitchen. 1984. Effects of mastitis on milk yield, milk composition, processing properties and yield and quality of milk products. *Aust. J. Dairy Techol.* 39, 7-16.
- Musser, J.M.B.; Anderson, K.L.; Caballero, M.; Amaya, D.; Maroto-Puga, J. 1998. Evaluation of a hand-held electrical conductivity meter for detection of subclinical mastitis in cattle. *American Journal of Veterinary Research.* 59(9): 1087-1091.

- Nagahata, H.; Saito, S.; Noda, H. 1987. Changes in N-acetyl-B-D-glucosaminidase y B-glucorinidase activities in milk during bovine mastitis. *Canadian Journal of Veterinary Research*. 51,126-134.
- Nielen, M.; Deluyker, H.; Schukken, Y.H.; Brand, A. 1992. Electrical conductivity of milk: Measurement, modifiers, and meta analysis of mastitis detection performance. *Journal of Dairy Science* 75:606–614.
- Nielen, M.; Schukken, Y.H.; Brand, A.; Haring, S.; Ferwerda-Van Zonneveld, R.T. 1995a. Comparison of analysis techniques for online detection of clinical mastitis. *Journal Dairy Science*, 78: 1050-1061.
- Nielen, M.; Spigt, M.H.; Schukken, Y.H.; Deluyker, H.A.; Maatje, K.; Brand, A. 1995b. Application of a neural network to analyze online milking parlor data for the detection of clinical mastitis in dairy cows. *Prev. Vet. Med.*, 22: 15-28.
- Nielsen, N.I., Larsen, T.; Bjerring, M.; Ingvarsen, K.L. 2005. Quarter Health, milking interval, and sampling time during milking affect the concentration of milk constituents. *Journal Dairy Science*. 88: 3186-3200.
- Norberg. E.; Hogeveen, H.; Korsgaard, I. R.; Friggens, N.C.; Sloth, K.H. M. N.; Lovendahl, P. 2004a. Electrical conductivity of milk: ability to predict mastitis status. *Journal Dairy Science*. 87, 1099-1107.
- Norberg. E.; Rogers, G.W.; Goodling, R.C.; Cooper, J.B.; Madsen. P. 2004b. Genetic Parameters for Test-Day Electrical Conductivity of Milk for First-Lactation Cows for Random Regression Models. *Journal Dairy Science*. 87:1917-1924.
- Nunes, G.R.; Blagitz, M.G.; Freitas, C.F.; Souza, F.N.; Ricciardi, M.; Stricagnolo, C.R.; Sanches, B.G.S.; Azedo, M.R.; Sucupira, M.C.A.; Della Libera, A.M.M.P. 2008. Evaluation of the indicators of inflammation in the diagnosis of ovine mastitis. *Arquivos do Instituto Biológico* 75: 271–278.
- Onyango, C.M.; Marchant, J.A.; Lake, J.R.; Stanbridge, D.A. 1988. A Low Maintenance conductivity sensor for detecting mastitis. *Journal Agric. Engng. Research*. 40: 215-224.
- Ostergaard, S. and Grohn, Y.T. 1999. Effects of diseases on test day milk yield and body weight of dairy cows from Danish research herds. *Journal Dairy Science*. 82:1188–1201.
- Paape, M.J.; Poutrel, B.; Contreras, A.; Marco, J.C.; Capuco, A.V. 2001. Milk somatic cell and lactation in small ruminants. *Journal Dairy Science*. 84, 237-244.
- Park, Y.W. 1991. Interrelationships between somatic cell counts, electrical conductivity, bacteria counts, percent fat and protein in goat milk. *Small Ruminant Research*. 5: 367-375.
- Peaker, M. 1977. The aqueous phase of milk: Ion and water transport. *Symp. Zool. Soc. London* 41, 113-134.

- Peris, C.; Molina, M.P.; Fernandez, N.; Rodriguez, M.; Torres, A. 1989. Variación en el conteo de células somáticas, CMT y conductividad eléctrica en leche de oveja según la fracción tomada en el ordeño. 4th International Symposium on machine milking of small ruminants. Tel-Aviv (Israel). Pp: 389-405.
- Peris, C.; Molina, M.P.; Fernandez, N.; Rodriguez, M.; Torres, A. 1991. Variation in somatic cell count, california mastitis test, and electrical conductivity among various fractions of ewe's milk. *Journal Dairy Science*. 74: 1553-1560.
- Peris, C., Díaz, J.R.; Fernández, N.; Rodriguez, M.; Molina, P.; Torres, A. 1998. Utilización de la conductividad eléctrica para la detección de mastitis en ganado ovino. XXIII Jornadas científicas de la Sociedad Española de Ovinotecnia y Caprinotecnia. Producción Ovina y Caprina, XXIII.
- Piccinini, R., Binda, E., Belotti, M., Daprà, V., Zecconi, A., 2007. Evaluation of milk components during whole lactation in healthy quarters. *Journal Dairy Research*. 74: 226-232.
- Pirisi, A.; Piredda, G.; Corona, M.; Pes, M.; Pintus, S.; Ledda, A. 2000. Influence of somatic cell count on ewe's milk composition, cheese yield and cheese quality. *Proceeding of the 6th Great Lakes Dairy Sheep Symposium*. Ontario. pp. 47-59.
- Prentice, J.H., 1962. The conductivity of milk – the effect of the volume and degree of dispersion of the fat. *Journal Dairy Research*. 29:131-139.
- Puri, B.R.; Parkash, S. 1963. Electrical conductivity of milk. *Indian Journal Dairy Science*. 16: 47-50.
- Pyörälä, S., 2003. Indicators of inflammation in the diagnosis of mastitis. *Veterinary Research* 34, 565-578.
- Rajala-Schultz, P.J.; Grohn, Y.T.; McCulloch, C.E.; Guard, C.L. 1999. Effects of clinical mastitis on milk yield in dairy cows. *Journal Dairy Science*. 82:1213–1220.
- Roca, A.; Romero, G.; Alejandro, M.; Muelas, R.; Peris, C.; Díaz, J.R. 2012. Efecto de la infección intramamaria en la actividad de la enzima N-acetil- β -D-glucosaminidasa (NAGasa) en la leche de ovejas de raza manchega. XXXVII Jornadas Científicas de la Sociedad Española de Ovinotecnia y Caprinotecnia (SEOC). Ciudad Real. pp. 300-305.
- Romero, G., Pantoja, J.C.F., Sendra, E., Peris, C., Díaz, J.R., 2012a. Analysis of the electrical conductivity in milking fractions as a mean for detecting and characterizing mastitis in goats. *Small Ruminant Research* 107:157– 163.
- Romero, G., Díaz, J.R., Sabater, J.M., Perez, C., 2012b. Evaluation of Commercial Probes for On-Line Electrical Conductivity Measurements during Goat Gland Milking Process. *Sensors*, 12, 4493-4513.
- Romero, G.; Reinemann, D.; Alejandro, M.; Díaz, J.R. 2014. Goat mastitis detection using daily records of milk conductivity: comparative results of different algorithms. *Czech J. Anim. Sci.* 59, 428–434.

- Romero, G.; Sendra, E.; Muelas,; Díaz, J.R. 2010. Effect of electrical conductivity of goat's milk on characteristics of fresh cheese. *Milchwissenschaft* 65(1): 56-59.
- Ruegg, M.; Bosset, J.O.; Pop, E.; Blanc, B. 1980. Die Bedeutung der elektrischen Leitfähigkeit für die Milchanalytik und Hygiene. Eine Literaturübersicht von 1954-1979. *Mitt. Geb. Lebensmittelunters. Hyg.* 71: 427-444.
- Rulquin, H. 1997. Regulation of the synthesis and the secretion of milk constituents in ruminants. *Renc. Rech. Rum.* 4:327–338.
- Santos, J.E.P.; Cerri, R.L.A.; Ballou, M.A.; Higginbotham, G.E.; Kirk, J.H. 2004. Effect of timing of first clinical mastitis occurrence on lactational and reproductive performance of Holstein dairy cows. *Anim. Repro. Sci.* 80: 31.
- Santos, R.A.; Mendonça, C.L., Afonso, J.A.B., Simão, L.C.V., 2007. Aspectos clínicos e característicos do leite em ovelhas com mastite induzida experimentalmente com *Staphylococcus aureus*. *Pesquisa Veterinária Brasileira* 27 (1), 6–12.
- SAS Institute Inc. 2009. V.9.2. User's guide. SAS Institute Inc., Cary, NC.
- Schaar, J. and Funke, H. 1986. Effect of subclinical mastitis on milk plasminogen and plasmin compared with that on sodium, antitripsina and N-acetyl- D-glucosaminidase. *Journal Dairy Research.* 53, 515-528.
- Schalm, O.W. and Noorlander, D.O. 1957. Experiments and observations leading to development of the California mastitis test. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 130, 199-204.
- Schultz, M.E.; Sydow, G. 1957. Die Chloridfreie leitfähigkeit von Milch und Milchprodukten. *Milchwissenschaft.* 12:174-177.
- Secchiari, P.; Mele, M.; Leotta, R.; Ferruzzi, G. 1999. Milk electrical conductivity on line and clinical mastitis detection in Italian Friesian cows. *Proceedings of ASPA XIII Congress.* Pp: 407-409.
- Seegers, H., Menard, J.L., Fourichon, C. 1997. Mastitis in dairy herds: Current extent, epidemiology and prevention. *Recontres Recherches Ruminants.* 4, 233-242.
- Seguya, A.G. and Mansell, P.D. 2000. An evaluation of a hand-held electrical resistance meter for the diagnosis of bovine subclinical mastitis in late lactation under Australian conditions. *Aust Vet Journal.* 2000:78:608-611.
- Sheldrake, R.F.; Hoare, R.J.; Woodhouse, V.E. 1981. Relationship of somatic cell count and cell volume analysis of goat's milk to intramammary infection with coagulase-negative staphylococci. *J. Dairy Res.* 48, 393-403.
- Sherlock, R.; Hogeveen, H.; Mein, G.; Rasmussen, M.D. 2008. Performance evaluation of systems for automated monitoring of udder health: Analytical issues and guidelines. Pages 275–282 in *Mastitis Control From Science to Practice.* T. J. G. M. Lam, ed. Proc. Int. Conf., Haag, the Netherlands. Wageningen Academic Publishers, Wageningen, the Netherlands.

- Shoshani, E.; Berman, A. 1998. Subclinical mastitis assessed by deviations in milk yield and electrical resistance. *Journal Dairy Research*. 65:31-41.
- Shuster, D.E.; Harmon, R.J.; Jackson, J.A.; Hemken, R.W. 1991. Suppression of milk production during endotoxin-induced mastitis. *Journal Dairy Science*. 74, 3763-3774.
- Steeneveld, W.; Van der Gaag, L.C.; Ouweltjes, W.; Mollenhorst, H.; Hogeveen, H.; 2010. Discriminating between true-positive and false-positive clinical mastitis alerts from automatic milking systems. *Journal Dairy Science*. 93:2559–2568.
- Stelwagen, K.; Farr, V.C.; McFadden, H.A. 1999. Alteration of the sodium to potassium ratio in milk and the effect on milk secretion in goats. *Journal of Dairy Science*. 82:52-59.
- Suarez, V.H.; Martinez, G.M.; Gianre, V.; Calvinho, L.; Rachoski, A.; Chavez, M.; Salatin, A.; Orozco, S.; Sanchez, V.; Bertoni, E. 2014. Relaciones entre el recuento de células somáticas, test de mastitis California, conductividad eléctrica y el diagnóstico de mastitis subclínicas en cabras lecheras. *Revista de Investigaciones Agropecuarias*. 40 (2). 145:153.
- Tangorra, F.M.; Zaninelli, M.; Costa, A.; Agazzi, A.; Savoini, G.. 2010. Milk electrical conductivity and mastitis status in dairy goats: results from a pilot study. *Small Ruminant Research*. 90:109-113.
- Tsenkova, R., Atanassova, S., Morita, H., Ikuta, K., Toyoda, K., Iordanova, I.K.; Hakogi, E. 2006. Near infrared spectra of cow's milk for milk quality evaluation: Disease diagnosis and pathogen identification. *Journal of Near Infrared Spectroscopy*. 14(6):363-370.
- Ward, P.P.; Paz, E.; Conneely, O.M. 2005. Multifunctional roles of lactoferrin: a critical overview. *Cellular Molecular Life Sciences*, 62 (22): 25406-2548.
- Welbeck, K.; Leonard, P.; Gilmartin, N.; Byrne, B.; Viguier, C.; Arora, S.; O'Kennedy, R. 2011. Generation of an anti-NAGase single chain antibody and its application in a biosensor-based assay for the detection of NAGase in milk. *Journal of Immunological Methods*. 364:14-20.
- Werner-Misof, C.; Macuhova, J.; Tancin, V.; Bruckmaier, R.M. 2007. Dose dependent changes in inflammatory parameters in the milk of dairy cows after intramammary infusion of lipopolysaccharide. *Veterinarni Medicina*. 52 (3): 95-102.
- Wiedemann, M. 2004. Überwachung der Eutergesundheit bei Milchkühen durch Kombination Verschiedener Chemisch-Physikalischer Messwerte. PhD Thesis. Technische Universität München, Germany.
- Wiedemann, M. and F. Wendl. 2004. The use of spectral photometry for detection of mastitis milk. *Automatic Milking: A Better Understanding*. Conference Proceedings, Lelystad, Netherlands, March. 228-234.

- Wilson, D.J.; Gonzalez, R.N.; Hertl, J.; Schulte, H.F.; Bennett, G.J.; Schukken, Y.H.; Grohn, Y.T. 2004. Effect of clinical mastitis on the lactation curve: a mixed model estimation using daily milk weights. *Journal Dairy Science*. 87:2073–2084.
- Woolford, M.W.; Willianson, J.H.; Henderson, H.V. 1998. Changes in electrical conductivity and somatic cell count between milk fractions from quarters subclinically infected with particular mastitis pathogens. *Journal Dairy Science*. 65: 187-198.
- Wójtowski, J.; Gut, A.; Danków, R. 1998. Somatic cell count and certain properties of milk as related to the clinical status of the udder of ewes from three synthetic lines. *Animal Science Papers and Reports*. 16: 137-145.
- Yildiz, H.; Kaygusuzoglu, E.; Simsek, H. 2006. Somatic cell count, electrical conductivity and biochemical parameters in mastitis milk in cows. *Indian Vet. J.* 83:498-500.
- Ying, C.; Wang, H.T.; Hsu, J.T., 2002. Relationship of somatic cell count, physical, chemical and enzymatic properties to the bacterial standard plate count in dairy goat milk. *Livest. Prod. Sci.* 74, 63–77.
- Ying, C.W.; Wang, H.T.; Hsu, J.T. 2004. Relationship of somatic cell count, physical, chemical and enzymatic properties to the bacterial standard plate count in different breeds of dairy goats. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*. 17 (4): 554-559.
- Zafalon, L.F.; Filho, A.N.; De Oliveira, J.V.; De Resende, F.D. 2005. Compostamento da condutividade eléctrica e do conteúdo de cloretos do leite como métodos auxiliares de diagnóstico na mastite subclínica bovina. *Pesa. Vet. Brasileira*. 25(3):159-163.
- Zaninelli, M.; Rossi, L.; Tangorra, F.M.; Costa, A.; Agazzi, A.; Savoini, G. 2014. On-line monitoring of milk electrical conductivity by fuzzy logic technology to characterise health status in dairy goats. *Italian Journal of Animal Science*. 13:340-347.
- Zaninelli, M.; Agazzi, A.; Costa, A.; Tangorra, F.M.; Rossi, L.; Saivoni. 2015. Evaluation of the Fourier Frequency Spectrum Peaks of milk electrical conductivity signals as indexes to monitor the dairy goats' health status by on-line sensors. *Sensors* 2015, 15, 20698-20716.
- Zaninelli, M.; Tangorra, F.M.; Costa, A.; Rossi, L.; Dell'Orto, V.; Savoini, G. 2016. Improved Fuzzy Logic System to Evaluate Milk Electrical Conductivity Signals from On-Line Sensors to Monitor Dairy Goat Mastitis. *Sensors*. 16:1079. doi:10.3390/s16071079.
- Zecconi, A.; Piccinini, R.; Giovannini, G.; Casinari, G.; Panzeri, R. 2004. Clinical mastitis detection by on-line measurements of milk yield, electrical conductivity and milking duration in commercial dairy farms. *Milchwissenschaft*. 59 (5/6): 240-244.
- Zecconi, A.; Smith, K.L. 2003. Ruminant mammary gland immunity. Bruxelles: FIL-IDF.

- Zhao, X.; Lacasse, P. 2008. Mammary tissue damage during bovine mastitis: causes and control. *Journal Animal Science*. 86 (Suppl.): 57-65.

