



**ESTUDIO DE LA TÉCNICA DE ULTRASONIDOS PARA  
DETERMINAR EL ESTADO DEL PEZÓN EN PEQUEÑOS  
RUMIANTES**

**TESIS DOCTORAL**

**2016**

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

**MANUEL ALEJANDRO MARTÍNEZ**

**ESTUDIO DE LA TÉCNICA DE ULTRASONIDOS  
PARA DETERMINAR EL ESTADO DEL PEZÓN  
EN PEQUEÑOS RUMIANTES**



*Miguel Hernández*

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

**Tesis Doctoral presentada por Manuel Alejandro Martínez para optar  
al título de doctor.**

**Director: José Ramón Díaz Sánchez**



Esta memoria ha sido presentada por D. Manuel Alejandro Martínez, Ingeniero Técnico Agrícola y M. Sc. en Agroecología, Desarrollo Rural y Ecoturismo, para optar al grado de Doctor por la Universidad Miguel Hernández de Elche

Fdo. Manuel Alejandro Martínez

Esta Tesis Doctoral ha sido dirigida por Dr. José Ramón Díaz Sánchez, Catedrático de Escuela Universitaria del Departamento de Tecnología Agroalimentaria de la Universidad Miguel Hernández de Elche,

Dr. José Ramón Díaz Sánchez  
Catedrático de Escuela Universitaria  
Tecnología Agroalimentaria  
Universidad Miguel Hernández de Elche





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

CERTIFICA:

Que la Tesis Doctoral titulada: “ESTUDIO DE LA TÉCNICA DE ULTRASONIDOS PARA DETERMINAR EL ESTADO DEL PEZÓN EN PEQUEÑOS RUMIANTES” de la que es autor el Ingeniero Técnico Agrícola y M. Sc. en Agroecología, Desarrollo Rural y Ecoturismo, Manuel Alejandro Martínez ha sido realizada dentro del programa de doctorado de Recursos y Tecnologías Agroalimentarias, bajo la dirección del Dr. José Ramón Díaz Sánchez, Catedrático de Escuela Universitaria del Departamento de Tecnología Agroalimentaria de la Universidad Miguel Hernández de Elche; la cual considero conforme en cuanto a forma y contenido para que sea presentada para su correspondiente exposición pública.

Y para que conste a los efectos oportunos firmo el presente certificado

Orihuela, \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de 2016.

Fdo.: Dr. José Ramón Díaz Sánchez



## Agradecimientos

La realización de esta Tesis ha conllevado un esfuerzo mayúsculo por parte de muchas personas, las cuales me han acompañado en este largo camino que se inició tiempo atrás. Esta Tesis es también de ellos, ¡Gracias!

En primer lugar quiero agradecer a mi director de Tesis, José Ramón Díaz Sánchez por haberme brindado la oportunidad de realizar este trabajo de investigación, así como también por la ayuda infinita durante la preparación, realización, análisis y posterior publicación de los resultados. Por la amistad y los consejos que me brindaste desde un primer momento, por el ejemplo de trabajo y dedicación que has sido para mí y por enseñarme cómo es y debe ser la investigación.

Quiero agradecer a la empresa ECM (Francia) y en especial a Patrice Emery por su colaboración y cesión de material ecográfico utilizado en esta Tesis Doctoral. Así como también al Ministerio de Educación y Ciencia y a los fondos FEDER (proyecto AGL2006-06909) por financiar esta investigación.

A Nemesio Fernández, Cristofol Peris, Martín Rodríguez y José María Sabater por la ayuda y colaboración en los artículos de investigación.

A Amparo Roca por su inconmensurable ayuda y apoyo durante los experimentos. Por esos fines de semana y festivos haciendo ecografías, por esas horas ordeñando a mano, por esas interminables jornadas de ordeño. Mi más sincero agradecimiento, ya que sin tu ayuda esta Tesis no habría sido posible.

A los trabajadores de la granja y a los becarios que ayudaron a que los animales siempre estuvieran en perfectas condiciones. En especial a Adriana Restrepo por su especial dedicación y por su optimismo. Mención especial a Ana Carrión, por los fines de semana y días de verano que pasó en la granja ayudando y siempre con una sonrisa en la cara, además por aquellas fotos después del esquileo de las ovejas que se convirtieron en una tradición.



A los alumnos de trabajo final de carrera: Mari Carmen Santos, Joaquina Conejero, María López de Haro, Amparo Roca y Alberto Durán. Gracias a todos por el gran esfuerzo y las largas jornadas que pasamos en la granja.

A Alberto Durán por su dedicación y entusiasmo en el ordeño mecánico, por su ayuda con los corderos y cabritos, las fotos y las pruebas en la máquina de ordeño, por esa vocación y pasión por el ordeño.

A Gema Romero, Estela Pérez y Raquel Muelas, amigas y compañeras. Por las horas de discusión sobre ordeño, reserva, rutinas y política. Por iniciarme en las “revisiones de máquinas”, por las “SEOCs” y las paellas en la granja, por los “San Isidros”, por los consejos y ánimos cuando más lo necesitaba.





*Dedicada a:*

*A mis padres y hermano que siempre me apoyaron y creyeron en mí, porque fueron mi inspiración y camino a seguir.*

*A Sara, Rafael y Leonardo que han sido la inspiración y mis fuerzas durante todo este tiempo.*

*Sara gracias por levantarme el ánimo cuando más lo necesitaba, por no dejarme tirar la toalla, por comprenderme y por el sacrificio que esta Tesis ha significado para ti, gracias por estar siempre a mi lado.*



## RESUMEN

El ordeño mecánico puede producir cambios a corto, medio y largo plazo en el estado del pezón de forma que, si no se realiza en condiciones adecuadas, pueden acentuarse afectando a la integridad del pezón y aumentando el riesgo de nuevas infecciones intramamarias. Los cambios a corto plazo están relacionados con la modificación de color, la apertura excesiva del esfínter del pezón y la variación del espesor (congestión/edema) de las paredes en la base y en la punta del pezón.

Con el objetivo general de estudiar la ecografía como método de estimación de los cambios del espesor del pezón producidos por el ordeño mecánico en pequeños rumiantes (ovejas de raza Manchega y cabras Muciano-Granadinas) se realizaron distintos estudios con el fin de alcanzar los siguientes objetivos específicos: **1)** Poner a punto la metodología de aplicación de la ecografía para este fin estudiando los equipos más adecuados para realizar las exploraciones ecográficas y la frecuencia de exploración óptima, además de comparar la técnica con otros métodos de estimación de variación de espesor del pezón como son el cutímetro y la termografía. **2)** Estudiar el efecto del ordeño mecánico en el espesor del pezón y el tiempo necesario para la recuperación del pezón tras el ordeño comparando con métodos considerados fisiológicos. **3)** Estudiar el efecto del sobreordeño, el tipo de manguito (manguitos utilizados en cabras diseñados para ovejas), estado (usados frente nuevos) y colocación de los manguitos (girados 45° sobre sus eje respecto a colocados correctamente) en el espesor del pezón.

**Para el objetivo 1** se plantearon cuatro estudios: 1) Estudio de la frecuencia de exploración ecográfica más adecuada; 2) Estudio del efecto del operario en la aplicación de la técnica; 3) Validación del método comparándolo con las mediciones realizadas con otro método de estimación (cutímetro) y realizando exploraciones ecográficas en ganado vacuno con la misma metodología; 4) Puesta a punto la técnica de medición de temperatura sobre las imágenes termográficas y estudio del efecto del estado sanitario de la glándula mamaria en la aplicación de la técnica y de la relación entre la termografía y la ecografía. En el primer estudio se realizaron 2 experimentos en donde se ensayaron las frecuencias de 3.5, 5, 7.5 y 10 MHz en cabras y 3.5, 5 y 7,5 MHz en

ovejas. En el segundo estudio, 2 operarios diferentes e independientemente realizaron ecografías en los mismos animales, eligieron la mejor imagen de exploraciones ecográficas grabadas en video y realizaron mediciones en imágenes ecográficas. En el tercer estudio, para validar el método ecográfico, se realizaron exploraciones ecográficas en 10 vacas Holstein utilizando la misma técnica desarrollada para ganado caprino y se realizaron mediciones con cutímetro en las cabras y ovejas. Por último, en el estudio 4 se realizaron imágenes termográficas en las dos glándulas y ecografías de los 2 pezones en cabras, antes y después del ordeño.

Se determinó el espesor de la pared del pezón (TWT), área de la pared del pezón (TWA), área de la punta del pezón (TEWA) en las imágenes ecográficas del pezón y el espesor del pezón con el cutímetro. En las imágenes termográficas se midió la temperatura en puntos y áreas concretas del pezón y de la ubre.

**Para el objetivo 2** se diseñaron 6 experimentos (3 en cabras y 3 en ovejas) en cuadrado latino en los que se comparó el ordeño mecánico con el amamantamiento de la cría, la extracción de leche mediante cánula y con el ordeño mecánico. Los experimentos se dividieron en dos periodos: en el primero, la glándula izquierda de todos los animales se ordeñó mecánicamente y en la derecha se aplicó el tratamiento correspondiente. Posteriormente, en el segundo periodo se intercambiaron los métodos de extracción. Durante el periodo experimental se realizaron 4 controles (2 en cada periodo experimental), en donde se realizaron ecografías antes e inmediatamente después del ordeño y a 1, 2, 3, 4, 6, 8 y 10 horas después del final del ordeño. En estos experimentos donde se determinó TWT, TWA, TEWA y longitud del canal del pezón (TCL).

**Para el objetivo 3** se realizaron 4 estudios en los que se diseñaron 7 experimentos en cuadrado latino (4 en cabras y 3 en ovejas) con 2 periodos experimentales. En el primer estudio se comparó el ordeño mecánico sin sobreordeño con un sobreordeño de 2 minutos en ovejas y cabras; En el segundo estudio se comparó el ordeño mecánico con manguitos nuevos versus el ordeño con manguitos usados (+3000 ordeños) en ovejas y cabras; En el tercer estudio se comparó un ordeño mecánico con manguitos correctamente colocados con un ordeño con manguitos girados 45° sobre su eje en ovejas y cabras. Por último, se comparó el efecto del ordeño de cabras con manguitos

diseñados para ovejas. Durante el periodo experimental se realizaron 4 controles, en donde se realizaron ecografías antes e inmediatamente después del ordeño en las que se determinó TWT, TWA, TEWA y TCL.

A partir de los resultados obtenidos se puede concluir que:

1. Las frecuencias de exploración más adecuadas para la realización de ecografías del pezón en cabras Murciano-Granadinas y ovejas Manchegas son 5 y 7,5 MHz.
2. Es necesario desarrollar herramientas informáticas (software) que permitan automatizar la elección y medición de las imágenes ecográficas para reducir el efecto subjetivo del operador que realiza esas operaciones.
3. La termografía infrarroja permite detectar cambios en la temperatura de pezón en ganado caprino debidos al ordeño mecánico. El área o punto más adecuado para determinar estos cambios se sitúa a 3 cm de la punta del pezón, puesto que esta área no fue afectada por el estado sanitario de la glándula mamaria.
4. En ganado caprino y ovino, el ordeño mecánico y otros métodos considerados fisiológicos (amamantamiento de la cría, extracción de leche por gravedad mediante cánula y ordeño manual) producen un aumento de TWT, TWA, TEWA y TCL comparado con los valores antes de la extracción de leche. En el caso del ganado caprino el incremento de estas variables es mayor con el ordeño mecánico realizado en perfectas condiciones que con los métodos fisiológicos, aunque, sería necesario realizar otros estudios para determinar si esos cambios son suficientes como para que se vea afectado el estado sanitario de la glándula mamaria.
5. En cabras Murciano-Granadinas el tiempo de recuperación del pezón a sus valores iniciales tras la extracción de leche es mayor a las 10 horas. En la práctica indicaría que éste es el tiempo mínimo adecuado para realizar un segundo ordeño.
6. En ovejas Manchegas el tiempo de recuperación del pezón a sus valores iniciales tras la extracción de leche varió en función del método de extracción de la leche: desde 1 hora después del ordeño manual hasta más de 10 horas en el caso del amamantamiento del cordero. En el caso del ordeño mecánico fue de 2 hasta 10 horas dependiendo de la variable medida y del experimento, indicando que en la práctica este sería el tiempo entre ordeños mínimo adecuado.
7. El sobreordeño de 2 minutos, el ordeño con manguitos con más de 3000 ordeños, y el ordeño con manguitos mal colocados (girados 45° sobre su propio eje) en ganado

caprino y ovino produjo congestión/edema de los tejidos del pezón lo que podría afectar los mecanismos de defensa del pezón. Además, las cabras Murciano-granadinas ordeñadas con pezoneras diseñadas para ganado ovino sufren un mayor incremento de espesor de las paredes del pezón.



## ABSTRACT

Mechanical milking can cause teat status changes in the short, medium or long term. If mechanical milking is not performed in appropriate conditions these changes can persist and affect the teat integrity, increasing the risk of new intramammary infections. Short-term changes are linked to colour modification, excessive opening of teat canal and to the teat wall and teat-end thickness (congestion/oedema).

With the general aim to study the ultrasound scanning as tool to estimate teat thickness produced by mechanical milking in small ruminant (Manchega ewes and Murciano-Granadina goats), several studies were conducted in order to achieve the following specific objectives: **1)** Fine tuning of the methodology of ultrasound scanning selecting the most suitable equipments and the optimum scan frequency, and compare the ultrasound technique with other teat-wall-thickness estimation methods such as cutimeter and infrared thermography. **2)** Study how machine milking affects teat wall thickness and teat canal length and their return after milking to pre-milking conditions in comparison with other milk extraction methods considered biological referents. **3)** Study the effect of overmilking, liner type (milking goats with liners designed for sheep), condition (+3000 milkings vs new liner), position (twisted 45° vs correctly mounted in the shell) on the teat thickness.

**Objective 1** 4 different studies were performed. 1) Study the most suitable ultrasound exploration frequency. 2) Study the effect of the operator in applying the technique. 3) Methods's validation comparing it with measurements taken by another estimation method (cutimeter) and performing ultrasound examinations in cows using the same methodology. 4) Fine tuning the temperature measuring technique for thermographic images, study the effect of mammary gland health status in application of the technique and study the relationship between thermography and ultrasound scanning as methods for estimating the effect of machine milking on teat wall thickness. In the first study, 2 experiments were carried out: were the frequencies 3.5, 5, 7.5 and 10 MHz in goats and 3.5, 5, 7.5 MHz in sheep were tested. In the second study, 2 different independent operators performed sonography on the same animals, chose the best image of ultrasound examinations recorded as a video sequence and carried out measurements on ultrasound images. In the third study, the technique tested in goats



was applied in Holstein cows and, finally, ultrasound scans were performed at 5 MHz frequency and cutimeter measurements taken in sheep and goats. In the fourth study, thermography images were taken in both glands, along with ultrasound scans of both goat teats, before and after milking.

The teat wall thickness (TWT), teat wall area (TWA) and teat-end wall area (TEWA) were determined in the ultrasound images and measure teat wall thickness by cutimeter. In the graphic images, it was determined the temperature at specific points and areas of the teat and udder.

**Objective 2**, 6 experiments were performed (3 in goats and 3 in sheep) in Latin squire design where mechanical milking was compared with other milk extraction methods considered biological referents: offspring suckling, milk removal by catheter and hand milking. Each of the Latin squares was divided into two periods: in the first, the left gland of each animal was machine milked and the corresponding treatment was applied to the right gland. Subsequently, in the second period the extraction methods were interchanged. During the experimental period, 4 sampling days were carried out (2 in each experimental period), where ultrasound scans were taken before and immediately after milking and at 1, 2, 3, 4, 6, 8 and 10 hours after milking finished. TWT, TWA and teat canal length (TCL) were measured in all the ultrasound images.

**In objective 3** four studies were performed, where 7 experiments were set up in Latin squire design (4 in goats and 3 in sheep) with 2 experimental periods. In the first study it was compared the effect of 2 minutes of overmilking with no overmilking in sheep and goat. In the second study, it was compared the effect of aged liners (+ 3000 milkings) with new liners in sheep and goat. In the third study, it was compared the mechanical milking with liner positioned correctly and liners twisted 45° in sheep and goat. Finally, it was compared the effect of milking goats with teatcup designed for sheep. During the experimental period 4 controls were carried out, performing ultrasound scans before and immediately after milking to determine TWT, TWA, TEWA and TCL.

Based on the results obtained it is possible to conclude the following:

8. Frequencies of 5 and 7.5 MHz are the most suitable for teat in Murciano-Granadina goats and Manchega sheep.
9. It is necessary to develop IT tools (software) to automate the choice and measurement of ultrasound images in order to reduce the operator effect.
10. Infrared thermography allows for detecting teat-skin temperature changes in goats due to machine milking. The area or point most suitable to detect these changes is located 3 cm from the teat-end, since this area or point it was not affected by the mammary gland health status.
11. In goats and sheep, the milking machine and other physiological methods of reference (offspring sucking, milk extraction by catheter and hand milking) increase TWT, TWA, TEWA y TCL compared to the pre-milking values. In goats, this increase is higher with mechanical milking carried out in appropriate conditions than with the physiological methods. However, it would be necessary further studies to determine if these changes could affect the sanitary status of the gland.
12. Teat recovery time was higher than 10 hours in Murciano-Granadina goats. This would indicate that 10 hours is the minimum milking interval time.
13. In Manchega ewes, teat recovery time ranged depending on the milk extraction methods used, from 1 (hand milking) to more than 10 hours (lamb sucking). Teat recovery time varied from 2 to 10 hours, depending on the variable, after mechanical milking, and this would indicate the minimum milking interval time.
14. 2 minutes of overmilking, milking with aged liners (more than 3000milings) and milking with liners twisted (45°) in sheep and goats produced congestion/oedema on teat tissue which could adversely affect teat defence mechanism. In addition to this, mechanical milking of Murciano-Granadina with teatcup designed for sheep, increases the teat wall thickness.



## INDICE

1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1. Importancia económica del ganado caprino y ovino lechero.....	3
1.2. Anatomía y morfología del pezón.....	5
1.2.1. Pezón.....	5
1.2.2. Vascularización.....	7
1.2.3. Sistema linfático.....	7
1.2.4. Sistema nervioso.....	8
1.3. Estado del pezón.....	9
1.3.1. Cambios a corto plazo.....	9
1.3.1.1. Congestión y edema de las paredes del pezón.....	10
1.3.1.2. Espesor de las paredes del pezón.....	11
1.3.1.3. Variación de los tejidos a nivel de las paredes y la punta del pezón.....	12
1.3.2. Cambios a medio plazo.....	14
1.3.3. Cambios a largo plazo.....	15
1.4. Métodos de estimación del estado del pezón.....	16
1.4.1. Métodos cualitativos.....	16
1.4.2. Métodos cuantitativos.....	17
1.4.2.1. Radiografía.....	18
1.4.2.2. Medición del flujo sanguíneo (efecto Doppler).....	18
1.4.2.3. Termografía infrarroja.....	19
1.4.2.3.1. Historia de la termografía infrarroja.....	19
1.4.2.3.2. Fundamento de la termografía infrarroja.....	19
1.4.2.3.3. Uso de la termografía infrarroja en medicina veterinaria y ordeño mecánico.....	20
1.4.2.3.4. Uso de la termografía infrarroja para detección temprana de mamitis.....	22
1.4.2.3. Cutímetro.....	22
1.4.2.4. Ecografía.....	24
1.5. Ecografía.....	25
1.5.1. Propiedades de los ultrasonidos.....	25
1.5.2. Formación de la imagen.....	26

1.5.3. Componentes de los equipos de ultrasonidos.....	27
1.5.4. Ecografía 3D.....	29
1.5.5. Procedimiento de medida recomendado.....	30
1.6. Efecto de la extracción de leche sobre el estado del pezón.....	35
1.6.1. Amamantamiento.....	35
1.6.2. Extracción mediante cánula.....	36
1.6.3. Ordeño manual.....	37
1.6.4. Ordeño mecánico.....	37
1.6.4.3. Manguitos.....	39
1.6.4.3.1. Vida útil.....	41
1.6.4.3.2. Tensión de montaje y colocación.....	43
1.6.4.4. Sobreordeño.....	43
1.6.5. Recuperación del pezón.....	44
2. OBJETIVOS.....	47
3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	51
3.1. Granjas experimentales.....	53
3.1.1. Granjas docentes y de investigación de la UMH.....	50
3.1.2. Granjas docentes y de investigación de la UPV.....	54
3.1.3. Granja comercial Pomares (Crevillente – Alicante).....	56
3.1.4. Granja comercial vacuno lechero (Orihuela – Alicante).....	56
3.2. Metodología seguida para la medición del espesor del pezón.....	57
3.2.1. Cutímetro.....	57
3.2.2. Ecografía.....	57
3.3. Diseño experimental y análisis estadístico.....	60
4. PUBLICACIONES.....	61
4.1. Use of ultrasound scanning to estimate teat wall thickness in Murciano-Granadina goats.....	63
4.2. Study of ultrasound scanning as method to estimate changes in teat thickness due to machine milking in Manchega ewes.....	75
4.3. Infrared thermography as a tool to determine teat tissue changes caused by machine milking in Murciano-Granadina goats.....	85
4.4. Effects of milk removal on teat tissue and recovery in Murciano-Granadina goats.....	95

4.5. How does the milk removal method affect teat tissue and teat recovery in dairy ewes?.....	103
4.6. Effects of overmilking and liner type and characteristics on teat tissue in small ruminants.....	113
5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	123
5.1. Puesta a punto de la técnica, determinación de la frecuencia de exploración más adecuada y comparación con otros métodos. Artículos 1, 2 y 3.....	125
5.1.1. Objetivos planteados en los artículos 1, 2 y 3.....	125
5.1.2. Frecuencia de exploración.....	126
5.1.3. Efecto del operario.....	128
5.1.4. Aplicación de la misma técnica de ecografía en ganado vacuno y comparación de la ecografía con el cutímetro.....	128
5.1.5. Uso de la termografía infrarroja estimador del estado del pezón y comparación con la ecografía.....	130
5.2 Efecto de la extracción fisiológica de leche y del ordeño mecánico en las paredes del pezón y tiempo de recuperación a los valores anteriores al ordeño. Artículos 4 y 5.....	131
5.2.1. Objetivos planteados en los artículos 4 y 5.....	131
5.2.2. Amamantamiento de la cría vs ordeño mecánico.....	132
5.2.3. Extracción de leche mediante cánula vs ordeño mecánico.....	132
5.2.4. Ordeño manual vs ordeño mecánico.....	133
5.2.5. Tiempo de recuperación del espesor de las paredes del pezón.....	133
5.3 Efecto del sobreordeño, tipo, estado y colocación de los manguitos en los tejidos el pezón de cabras Murciano-Granadinas y ovejas Manchegas Artículo 6.....	134
5.3.1. Objetivos planteados en el artículo 6.....	134
5.3.2 Efecto del sobreordeño (no sobreordeño vs sobreordeño 2 minutos)..	135
5.3.3. Efecto del estado de los manguitos (nuevos vs +3000 ordeños).....	135
5.3.4. Efecto de la colocación de los manguitos (normal vs girados 45°)...	136
5.3.5. Efecto del ordeño de cabras con manguitos diseñados para ovejas...	136
6. CONCLUSIONES.....	139
7. BIBLIOGRAFÍA.....	143





## ***1. INTRODUCCIÓN***





### **1.1. Importancia económica del ganado caprino y ovino lechero**

La producción de caprino y ovino en España ha estado ligada a sistemas de producción semiextensivos o tradicionales. Sin embargo, en los últimos años se ha visto incrementado el uso de sistemas de explotación intensivo o semiintensivo que puedan aprovechar todo el potencial de las razas más productivas.

El principal destino de la leche de oveja y cabra es la elaboración de quesos y cuajadas, siendo la leche fluida un producto casi marginal. Además, el sector tiene características especiales como es la marcada estacionalidad de la producción y del precio de la leche, así como los problemas en el cumplimiento de la normativa sobre etiquetado de quesos elaborados con distintas leches (MAGRAMA, 2016).

Desde el 2002, el número de cabezas de ganado ovino en España ha descendido drásticamente, desde casi 24 millones en 2002 a un poco más de 15 millones en 2014, en ganado caprino la disminución no ha sido tan acusada aunque el descenso ha sido de aproximadamente 11% (300000 animales) en el mismo periodo de tiempo. También se ha visto reducido el número de cabras y ovejas en ordeño. Desde el año 2002 hasta el 2014 el número de cabras y ovejas en ordeño se ha reducido en 31 y 41%, respectivamente. Sin embargo la producción de leche de cabra ha disminuido 1% y la de oveja se ha incrementado en 37 % respectivamente lo que implica una mejora de la productividad de las explotaciones.

La producción total de leche de cabra en el año 2013 fue 471000 t y la producción de leche de oveja fue 600600 t lo que representa el 6,2 y el 7,9 % de la producción total de leche en España (MAGRAMA, 2016). La importancia económica de la leche de cabra y oveja ha seguido una evolución positiva y en 2014 representó el 25% del valor de la producción láctea de España, lo que supone alrededor de 797 millones de euros. Asimismo, representa el 4 % de la producción final ganadera y el 1,5% de la producción final agraria (MERCASA, 2016). A nivel europeo, en 2014 España fue el segundo productor tanto en leche de cabra por detrás de Francia y de leche de oveja por detrás de Grecia (EUROSTAT, 2016).

La producción de leche de oveja en España está concentrada en dos Comunidades, Castilla la Mancha y Castilla y León con casi el 65% de la producción. En el caso de la leche de cabra, la producción se concentra, con el 95% de la producción total, en 5 Comunidades Andalucía, Castilla la Mancha, Extremadura, Canarias y Murcia.

El sector caprino y ovino lechero se encuentra en una situación de adaptación a los cambios legislativos nacionales (RD: 1363/2012) y europeos (Reglamento UE: 261/2012) que regulan a las organizaciones ganaderas e interprofesionales, así como a las relaciones entre el ganadero y la industria. Además, desde el 2007 se ha incorporado a la leche de cabra y oveja en el sistema de gestión de calidad y trazabilidad “Letra Q”. Por otra parte, en el 2010 se ha incorporado el contrato tipo-homologado de leche de cabra y se ha puesto en marcha el programa integral de comercialización de leche de cabra y oveja con vista al 2015. Estas iniciativas legislativas y de regulación orientadas al reequilibrio del mercado de leche van a suponer cambios en el sector y en la forma de gestionar las ganaderías, además de tener como objetivo la mejora de la calidad de leche.

## 1.2. Anatomía y morfología del pezón

En la cabra y en la oveja, la ubre está situada en la región inguinal y ocupa la cara interna de los muslos. Consta de dos glándulas mamarias independientes bajo una única bolsa de piel, separadas por una pared intermedia de tejido conectivo (*Ligamentum suspensoris uber*) claramente definida, y cada una de ellas está envuelta por una bolsa de tejido conectivo fibroelástico (*Apparatus suspensorius mammarum*).

Cada glándula termina en un solo pezón, aunque hay ovejas que poseen pezones supernumerarios principalmente localizados detrás del pezón verdadero (Haenlein y Caccese, 1992). La longitud, diámetro, implantación y dirección de los pezones influye en la ejecución del ordeño. Los pezones deben estar situados en la base de las glándulas para favorecer la salida de la leche y evitar la formación de bolsas donde pueda quedar leche retenida, así como estar dirigidos ligeramente hacia adelante y abajo o completamente verticales (Fernández y Rodríguez, 1994; Callejo, 1996).

### 1.2.1. Pezón

La pared del pezón está compuesta de tres capas. La primera capa (la capa más exterior) es la piel que ha sido formada desde la epidermis y la dermis. Esta capa tiene algunos finos pelos asociados a grupos de glándulas sebáceas rodeando los folículos de pelo principalmente en la base del pezón. La segunda capa es la capa fibro-muscular-vascular la cual es la capa más gruesa y forma el mayor espesor de las paredes del pezón, está compuesta principalmente de tejido conectivo denso hecho de un haz de fibras de colágeno, fibroblasto y fibras elásticas, vasos sanguíneos y grupos pequeños de glándulas accesorias especialmente en la base del pezón. La tercera capa (la capa más interna) es un epitelio que recubre el seno del pezón. Esta capa está compuesta por 2 capas de células cuboidales (Mahdi, 2009).

El canal del pezón es una estructura consistente de varios pliegues de membrana mucosa con pliegues secundarios que se proyecta hacia adentro de la cisterna del pezón para dejar sólo un orificio estrellado. La unión de la cisterna del pezón y el conducto estriado se conoce como Roseta de Fürstenberg, la cual ayuda en la retención de la leche

dentro del pezón y funciona como tapón y sellado cuando la presión dentro de la ubre aumenta. Esta roseta cierra la cisterna del pezón y previene la fuga de leche (Haenlein y Caccese, 1992).

El canal del pezón está cubierto con el mismo tipo de epitelio que la piel normal, con un sistema músculo elástico en forma de red que facilita la apertura y cierre. Giesecke et al. (1972) sugieren que el canal del pezón se abre por contracciones de la musculatura lisa y se cierra por el movimiento de torsión producido por el retroceso de las fibras elásticas dentro de la estructura del canal. Hamann y Burvenich (1994a) describen el cierre del canal del pezón como un proceso activo de la musculatura lisa en la pared del pezón que es distribuida en un complejo espiral u oblicuo-circular de células que empiezan en la base del pezón y terminan en el canal del pezón. El tono muscular de la punta del pezón se mantiene gracias al sistema nervioso autónomo simpático (Peteers et al., 1949). Este tono muscular está determinado genéticamente por la relación de receptores adrenérgicos  $\beta_2/\alpha_2$  (Vandeputte-van Messom et al., 1986).

En la entrada del canal del pezón se encuentra una sustancia cerosa llamada queratina y forma parte de los mecanismos primarios de defensa del canal del pezón frente a la penetración de microorganismos a la glándula mamaria (Williams y Mein, 1985; Lacy-Hulbert y Hillerton, 1995). Esta función es consecuencia, por un lado, de su acción bactericida y, por otro, de su poder de adherencia de los microorganismos que intentan penetrar por el canal del pezón a la glándula y que en el ordeño siguiente son expulsados mediante el flujo de leche.

No hay ningún vaso sanguíneo o linfático en la epidermis del canal del pezón, la cual es alimentada por difusión desde la dermis adyacente y por el plexo cutáneo vascular (Paulrud, 2005). Jankus y Baumann (1986) examinaron el flujo de sangre en la parte distal del pezón de vacas lecheras y descubrieron que el flujo hacia el epitelio del canal del pezón y la porción papilar del *stratum papillare* era 4 veces mayor que el flujo de sangre en las estructuras equivalentes de la mucosa de la roseta de Fürstenberg. Estos autores indican que el mayor flujo de sangre en la parte distal del pezón podría explicarse por una mayor secreción de sustancias antimicrobianas o por una mayor síntesis de células epiteliales de reemplazo debido a la pérdida de *stratum corneum* durante el ordeño.

### 1.2.2. Vascularización

El principal suministro de sangre a la ubre de la cabra y oveja es la arteria pudenda externa (Ruberte et al., 1994; Luiz, y Miglino, 2000), Esta arteria realiza la irrigación sanguínea de cada mitad, que deriva del tronco pudendo-epigástrico.

Al penetrar en la glándula, la arteria mamaria se bifurca, en sentido paralelo a la pared abdominal, dando lugar a las arterias mamarias craneal y medial (Luiz y Miglino, 2000) o caudal (Ruberte et al., 1994; González-Romano et al., 2000) que envían diversas ramificaciones por toda la glándula mamaria y la piel de la región glandular.

El pezón, en ganado ovino, recibe sangre arterial de la *arteria mamaria medialis* (Ruberte et al., 1994) que a nivel del pezón se transforma en las arterias papilares, las cuales forman dos plexos arteriales, uno en la zona media del pezón y otro a nivel del orificio del pezón. Por otro lado, el pezón está drenado por las venas papilares que, a nivel de la base del pezón, forman el círculo venoso del pezón y por los vasos linfáticos mamaros, que forman un plexo alrededor del pezón.

En la capa muscular de la pared del pezón se localizan varias venas papilares, las cuales están organizadas en un plexo venoso que desemboca en el anillo venoso de la roseta de Fürstenberg.

### 1.2.3. Sistema linfático

Los vasos linfáticos recogen la linfa de los tejidos de la glándula mamaria dirigiéndose hacia la región dorso caudal de la ubre donde se encuentra el nódulo linfático supramamario. En ovejas son dobles, uno mayor que otro y se sitúan caudodorsalmente a las mamas (Ruberte et al., 1994).

El sistema linfático de la pared del pezón forma un cuerpo cavernoso linfático, que se vuelve turgente durante el amamantamiento u ordeño (Hamann y Burvenich, 1994a; Blowey y Edmondson, 1995), favoreciendo el flujo de leche desde la cisterna de

la glándula hacia la cisterna del pezón. Su estructura es compleja, y se encuentra formando una red de forma poligonal tridimensional que rodea al pezón.

La linfa se desplaza gracias a las diferencias de presión entre los vasos linfáticos y la vena cava anterior, donde la linfa acaba desembocando. La presión existente en los capilares sanguíneos, la contracción de los músculos y los movimientos del animal especialmente de la ubre, ayudan al movimiento de la linfa dentro de los vasos linfáticos (Isaksson y Lind 1992).

#### **1.2.4. Sistema nervioso**

La ubre de la cabra esta inervada por un nervio primario (inguinal externo) que se divide en dos ramas. La rama superficial recorre los músculos abdominales y la rama más profunda pasa a través del anillo inguinal, siguiendo la arteria y la vena pudenda externa en la ubre. Esta rama se divide en otras dos. Estas dos nuevas ramas se denominan *ramus medio* y *ramus inferior*. En la base de la ubre, el *ramus medio* se divide en 3 ramas, la más pequeña de las tres inerva la vena pudenda, la mayor (*ramus papilar*) entra en el pezón, y el *ramus glandularis*, está junto a los conductos de leche largos y la cisterna de la ubre (Haenlein y Caccese, 1992). Algunas inervaciones de la piel están también irrigadas por los nervios cutáneos lumbares craneales y el brazo mamario del nervio lumbar caudal (Smith y Sherman, 2009).

### 1.3. Estado del pezón

El pezón es una unidad funcional que tiene tres principales funciones fisiológicas (Hamann y Burvenich, 1994a):

- Función sensorial
- Función motora
- Función defensiva

Para que el pezón pueda realizar estas tres funciones adecuadamente tiene que mantener saludable su estructura anatómica y fisiológica.

El pezón puede verse afectado por las condiciones ambientales (clima, insectos, agentes químicos, etc.), por agentes infecciosos (herpes, papiloma, etc.) y por el ordeño mecánico (edema, congestión, cambio de color, hiperqueratosis, etc.) (Hillerton et al., 2002). Mein et al. (2001) indican que el ordeño mecánico puede producir a nivel del pezón cambios a corto, medio y largo plazo.

#### 1.3.1. Cambios a corto plazo

Los cambios a corto plazo son principalmente producidos por mal funcionamiento del equipo de ordeño o por fallos de manejo durante el mismo (Ohnstad et al., 2007). En la mayoría de los casos estos cambios se pueden apreciar después de un solo ordeño. Los cambios a corto plazo pueden ser de varios tipos: cambios de color de la piel del pezón, dureza o inflamación del pezón, formación de anillo en la base del pezón, grado de apertura del esfínter del pezón (Mein et al., 2001; Ohnstad et al., 2007) y edema y congestión de los tejidos del pezón (Hamann et al., 1994b). La mayoría de los cambios a corto plazo mencionados (color, hinchazón, apertura de esfínter, etc.) son evaluados y clasificados cualitativamente en categorías previamente definidas con la ayuda de fotografías, esquemas y palpación del pezón, lo que facilita su aplicación en situaciones prácticas (Mein et al., 2001). A diferencia de los anteriores, la congestión y edema de los tejidos del pezón se pueden estimar de forma cuantitativa y precisa mediante la variación del espesor de las paredes y la punta del pezón (Hamann y Mein, 1996).



### 1.3.1.1. Congestión y edema de las paredes del pezón

El ordeño mecánico tiene como objetivo obtener la mayor cantidad de leche, de la mejor calidad, en el menor tiempo posible sin dañar o alterar la integridad del pezón del animal. Para ello, el pezón, dentro del manguito de ordeño, es sometido a vacío a intervalos de tiempo constantes. Esto sucede cuando las paredes del manguito se mantienen abiertas (fase “A” y “B” del ciclo de pulsación), en ese momento el vacío actúa directamente sobre el pezón y genera unas fuerzas que van a alargar el pezón, abrir el canal del pezón y permitir el flujo de leche desde el pezón (Hamann y Mein, 1996). Sin embargo, el vacío durante la fase “B” va a generar congestión en los tejidos del pezón (Mein y Reinemann, 2009). La congestión producida durante la fase “B” es aliviada cuando las paredes del manguito se colapsan sobre la punta del pezón (fase “D”, del ciclo de pulsación), de esta forma cesa el flujo de leche y se producen unas fuerzas de compresión sobre los tejidos internos de la punta del pezón que ayudan a la reevacuación de los líquidos acumulados (van de Tol et al., 2010).

El término congestión o hiperemia se define como la acumulación de sangre en los tejidos del pezón debido principalmente a la acción del vacío de ordeño (Hamann y Burvenich, 1994b). Estos autores realizan una distinción entre hiperemia arterial o activa, cuando es debida a una actividad muscular, y venosa o pasiva, cuando la falta de flujo produce un estancamiento de sangre. En este sentido, es preciso destacar que existen diferencias en la interpretación de la congestión producida por el ordeño mecánico. Mientras algunos autores indican que el ordeño mecánico provoca una congestión pasiva (Hamann y Mein, 1988; Hamann et al., 1994a; 1994b), otros autores indican que esta congestión es activa (Isaksson y Lind 1992; Isaksson y Lind 1994). Sin embargo, todos los autores coinciden en mencionar que esta congestión no es necesariamente un proceso patológico sino que se encuentra dentro de una reacción fisiológica normal.

El término edema refiere a la acumulación de fluido pobre en proteína en el espacio intersticial debido a un desequilibrio entre la capacidad de filtración y reabsorción en el lecho vascular. Esto es debido a una interferencia en los mecanismos

de intercambio de fluidos. Cuando la causa que provoca el edema actúa de forma permanente, se produce una acumulación de fluidos que hace que el edema se vuelva estacionario. Si, además, se produce una acumulación de productos secundarios linfáticos en el tejido se inducirá una deposición de colágeno originando un edema crónico (Hamann y Burvenich, 1994a).

Por otro lado, el edema inflamatorio es la infiltración de fluidos en los tejidos como consecuencia de un aumento de la presión capilar debida a la dilatación de los vasos y a la reducción local de la corriente sanguínea (Hamann y Burvenich, 1994b).

Según Hamann y Mein (1990), la persistencia de la congestión/edema del pezón dependerá de las condiciones del ordeño. Los factores relacionados con la máquina de ordeño (características de los manguitos, parámetros de ordeño, etc.), que pueden provocar una reacción en los tejidos del pezón, serán mencionados con detalle en la sección 1.6.

#### 1.3.1.2. Espesor de las paredes del pezón

La medición de la variación del espesor de los tejidos del pezón es una manera fiable y práctica de estimar la congestión y/o edema producido por el ordeño mecánico. En un primer momento, estas variaciones de espesor fueron medidas con un instrumento de muelle calibrado llamado cutímetro. El cutímetro permite determinar pequeños cambios en el espesor de la punta del pezón con un alto grado de precisión ( $\pm 2\%$ ) y repetibilidad ( $r = 0,99$ ) (Hamann y Mein, 1988; Isaksson y Lind, 1992).

Posteriormente, con el desarrollo de nuevos equipos instrumentales como la ecografía (Neijenhuis et al., 2001; Gleeson et al., 2002; Wójtowski et al., 2006; Ślósarz et al., 2010) y la termografía (Paulrud et al., 2005; Stelletta et al., 2007; Vegricht et al., 2007) se han desarrollado métodos de estimación muy fiables y prácticos de los cambios en los tejidos del pezón. Estos métodos de estimación se estudiarán en más detalle en las secciones 1.4 y 1.5.

Durante el periodo de alto flujo del ordeño el espesor de las paredes del pezón a nivel de la punta se reduce. Esta reducción es consecuencia directa de la elongación del pezón producida por el vacío al inicio del ordeño. Después del periodo de alto flujo de leche los valores de espesor aumentan debido a los cambios circulatorios que se presentan a nivel de la punta del pezón (Isaksson y Lind, 1992) lo cual podría deberse a dos factores. El primero podría ser debido al aumento del flujo sanguíneo hacia la ubre durante el ordeño, el cual a través de las anastomosis presentes a nivel del pezón podría incrementar la presión sanguínea también a nivel de las venas produciendo congestión (Isaksson y Lind, 1992). El segundo podría deberse a que el vacío de ordeño puede disminuir las contracciones naturales que ocurren en el pezón, que ayudan a evacuar los fluidos de los tejidos del pezón y a que el masaje del manguito sobre el pezón no es suficiente para la eliminación de los fluidos acumulados (Paulrud et al., 2005).

La estimación del espesor de la pared del pezón se debe realizar antes e inmediatamente después del ordeño y las variables obtenidas dependerán del equipo instrumental utilizado. Así, con el cutímetro se obtiene el espesor de los tejidos del pezón (EP) a 1 cm del final del pezón, aproximadamente (Hamann y Mein, 1996; Isaksson y Lind, 1992). Este espesor no tiene en cuenta la congestión producida debido a que la presión de los muelles es superior a la presión interna de los vasos sanguíneos a nivel del pezón (Hamann y Mein, 1988). Con la ecografía se puede estimar la congestión y edema de los tejidos, ya que a diferencia del cutímetro, no ejerce ninguna presión sobre el pezón. De esta forma se puede obtener los valores de espesor de la punta del pezón a nivel de la roseta de Fürstenberg, espesor de las paredes del pezón a 1 – 1.5 cm de la roseta de Fürstenberg, el espesor de la cisterna del pezón, y la longitud y diámetro del canal del pezón.

#### 1.3.1.3. Variación de los tejidos a nivel de las paredes y la punta del pezón

En ganado vacuno, diversos autores han encontrado que el ordeño mecánico puede provocar un aumento (Hamann y Mein, 1988; Isaksson y Lind, 1992), disminución (Hamann y Mein, 1988; Zecconi et al., 1992) o no producir ninguna alteración (Hamann et al., 1993) en el espesor de las paredes del pezón medido con cutímetro. Estas diferencias en los resultados obtenidos por los distintos autores son debidas a los distintos parámetros

(nivel de vacío, velocidad de pulsación, etc.) y equipos utilizados (aplicación o no de presión positiva en la cámara de pulsación).

En pequeños rumiantes, el espesor de las paredes del pezón, medido con cutímetro, también puede reducirse o incrementarse después del ordeño mecánico. Sinapis et al. (2006), indican que el espesor del pezón (TT) después del ordeño se reduce si se ordeña con niveles de vacío de 38 kPa, sin embargo al aumentar el nivel de vacío a 44 y 50 kPa los valores de TT después del ordeño aumentan (0,06 y 0,22 mm). Por otra parte Peris et al. (2003a), encontraron valores de diferencia negativas en el TT (después – antes) en ovejas manchegas ordeñadas a 36 y 42 kPa, e incluso cuando se produjo un sobreordeño de 1,5 a 2 minutos (Peris et al., 2003b). En ganado caprino, Billon et al. (2000) encontraron que la variación de espesor del pezón es positiva y del orden de 0,1-0,3 mm, al igual que Skapetas et al. (2008) en cabras griegas. Manzur et al. (2012), en cabras Murciano-Granadinas indican que la variación de TT es de 0,17 – 0,19 mm.

Sin embargo, cuando la estimación de las paredes del pezón se realiza con la técnica de la ecografía, la variación del espesor siempre es positiva (mayor valor después del ordeño) tanto en vacuno (Naumann y Fahr, 2000; Neijenhuis et al., 2001; Gleeson et al., 2002; Paulrud et al., 2005; Stádník et al., 2010; Pařilová et al., 2011), como en caprino (Fahr et al., 2001; Ślósarz et al., 2010) y ovino (Wójtowski et al. 2006).

La variación de espesor de las paredes del pezón varía entre 30 y 40 % en caprino (Fahr et al., 2001; Ślósarz et al., 2010), 16-17% en ovino (Wójtowski et al. 2006) y entre 20 - 50% en ganado vacuno (Neijenhuis et al., 2001; Paulrud et al., 2005).

No existen muchos estudios que analicen la relación del espesor de las paredes del pezón con la incidencia de infecciones intramamarias. Sin embargo, Zecconi et al. (1992) indican que es necesario evitar elevadas variaciones positivas (mayor espesor después que antes de ordeño) o negativas (menor espesor después que antes de ordeño) del espesor de la punta del pezón ( $> +5\%$  y  $> -5\%$ ). Estos autores encontraron que cuando el espesor del pezón variaba en más de  $\pm 5\%$  se incrementaba la colonización del canal del pezón, aumentando el riesgo de nuevas infecciones intramamarias. En ganado caprino, Fahr et al. (2001) observaron que los animales con un recuento de células somáticas (SCC) de más de 1 millón de células / ml presentan un espesor de pared del pezón mayor en comparación

con aquellos con un menor recuento, tanto antes (5,09 mm frente a 4,75 mm) como después del ordeño (5,16 mm vs 4,88 mm).

### **1.3.2. Cambios a medio plazo**

Son aquellos cambios que son apreciables a los pocos días o semanas de comenzar el ordeño. La máquina de ordeño puede producir pequeñas hemorragias (petequiales) debido a problemas en la pulsación o hemorragias fuertes (daños vasculares) asociadas a altos niveles de vacío y fallos en el movimiento del manguito (Ohnstad et al., 2007).

Las temperaturas extremas de frío y calor, baja humedad, elevados vientos, etc. transforman la piel sana de los pezones (lisa, blanda y brillante) en escamosa, irritada y agrietada, perdiendo la capa externa protectora de agentes bactericidas que posee y favoreciendo, sobre todo si se producen lesiones abiertas, la colonización de microorganismos patógenos en la glándula mamaria (Mein et al., 2001). Además los cambios de clima también pueden causar aspereza y agrietamiento de los pezones, los cuales pueden producirse en 1 o 2 días durante cambios climáticos severos (Ohnstad et al., 2007). Esta situación puede agravarse en explotaciones al aire libre con deficiente mantenimiento de las zonas de reposo donde los pezones al cubrirse de barro se resecan como consecuencia de que éste absorbe la humedad de la piel.

También se pueden producir alteraciones en la piel del pezón debido a irritación química por el uso o concentración no adecuados de desinfectantes o emolientes en los productos utilizados para el proceso de pre-dipping o post-dipping. También podrían ocurrir si se utilizan productos químicos agresivos que pueden producir hiperplasia de la epidermis conduciendo a un engrosamiento y descamación de la piel (Ohnstad et al., 2007).

Es preciso destacar que el ordeño mecánico puede acentuar las alteraciones producidas inicialmente en el pezón por otros factores no infecciosos (climáticos y químicos), o que estos acentúen los efectos producidos por el ordeño mecánico.

### **1.3.3. Cambios a largo plazo**

Los cambios a largo plazo son: lesiones (heridas) en la piel y paredes del pezón e hiperqueratosis o crecimiento excesivo de queratina en el exterior del canal del pezón (Mein et al., 2001). Según Neijenhuis et al. (2001), una leve hiperqueratosis puede ser beneficiosa frente a infecciones intramamarias ya que mantiene el orificio del canal protegido; sin embargo, cuando la hiperqueratosis es severa puede aumentar el riesgo de infecciones intramamarias, ya que los pliegues o extensiones de flecos de queratina formados entorno al orificio del canal del pezón impiden una perfecta desinfección del extremo de éste, además de dificultar el cierre adecuado del esfínter y ser utilizado por los microorganismos como vía de entrada al pezón.



#### **1.4. Métodos de estimación del estado del pezón**

El ordeño mecánico puede producir una alteración en la dinámica de los fluidos en los tejidos del pezón, y como consecuencia un efecto negativo en los mecanismos de defensa del pezón (Paulrud et al., 2005). La evaluación del estado del pezón es una herramienta útil para estimar el efecto de la rutina de ordeño, de los componentes y parámetros de la máquina de ordeño y del medio ambiente (Hamann y Mein, 1996; Mein et al., 2001).

Los métodos utilizados para la evaluación del estado del pezón se clasifican en:

1. Métodos cualitativos. Son sistemas de clasificación basados en comparación con fotografías, esquemas de clasificación en categorías previamente definidas y/o métodos de visualización y palpación del pezón.
2. Métodos cuantitativos. Se realizan con la ayuda de equipos instrumentales.

##### **1.4.1. Métodos cualitativos**

Los métodos cualitativos, aunque menos objetivos que los instrumentales, presentan la ventaja de poder ser aplicados fácilmente por cualquier ganadero o técnico sin necesidad de una inversión inicial y, además, permiten la evaluación de diferentes parámetros que, en conjunto, caracterizan el estado del pezón.

Estas evaluaciones tienen en cuenta los cambios de color del pezón y la dureza y formación de anillos en la base del pezón así como también el grado de hiperqueratosis (Shearn y Hillerton, 1996; Neijenhuis et al., 2000; Hillerton et al., 2000; 2002)

La condición del pezón puede indicar el nivel de estrés al que es sometido el pezón y a su vez dar información del nivel de confort de los animales durante el ordeño (Reinemann, 2007). Sin embargo, clasificar los pezones en función de todos los cambios descritos anteriormente es una tarea difícil de llevar a cabo sin alterar significativamente la rutina de ordeño (Reinemann, 2007). Es por ello que diversos autores (Goldberg et al., 1994; Britt y Farnsworth, 1996; Mein et al., 2001; Casirani et

al., 2002) han desarrollado métodos para estimar la condición del pezón analizando varias características a la vez.

El Teat Club International (Mein et al., 2001) sugirieron que la medición de la condición del pezón se realice en una muestra representativa de los animales (20% o por lo menos 80 vacas), aunque otros autores indican que cuando se hace una evaluación en el tiempo es posible utilizar sólo 40 pezones escogidos al azar (Casirani et al., 2002), y en caso de no superar los valores recomendados que a continuación se detallan, no sería necesarios estudios más detallados:

- Cambio de color: 20%.
- Hinchazón en la base del pezón: 20%
- Hinchazón y dureza en la punta del pezón: 20%.
- Apertura del esfínter del pezón: 20%.
- Lesiones vasculares: 10%.
- Lesiones en la piel del pezón: 5%
- Hiperqueratosis en el final del pezón: 20% rugosos, 10% muy rugosos.

#### **1.4.2. Métodos cuantitativos**

Se han descrito muchos métodos que permiten determinar los cambios en los tejidos del pezón (medidas de impedancia, pérdida de agua transepidermica, técnicas de radiografía, flujometría de láser doppler, medida de temperatura de la piel del pezón, cutímetro y ecografía, entre otros), y aunque presentan la ventaja de obtener resultados más objetivos que los métodos cualitativos, algunos de ellos tienen el inconveniente de la complejidad del método y la disponibilidad de equipos (técnicas de radiografía, medidas de impedancia), o la dificultad en la interpretación de los resultados (pérdida de agua transepidermica y medición del flujo sanguíneo), lo cual dificulta su uso a nivel de campo.



#### 1.4.2.1. Radiografía

Los primeros estudios con la técnica de radiografía analizaron pezones de vacas con problemas de flujo de leche (Kubicek 1972; Witzig y Hugelshofer, 1984; Alacam et al., 1990). Utilizando distintos métodos de contraste (contraste negativo, contraste positivo y doble contraste) pudieron interpretar y diagnosticar los problemas de los pezones, principalmente con el método del doble contraste en la zona distal del pezón, detectando anomalías en el canal del pezón, deformaciones y rotura de mucosa en la roseta de Fürstenberg. Sin embargo, el problema de la disponibilidad y transporte de las máquinas de rayos X, la dificultad en la ejecución y la exposición a la radiación y hacen poco práctico el uso de esta técnica (Hospes y Seeh, 2000). A pesar de ello, el uso de la radiografía puede ser útil para el estudio académico de anatomía de la glándula mamaria (González-Romano et al., 2000).

#### 1.4.2.2. Medición del flujo sanguíneo (efecto Doppler)

En 1842, Christian Doppler encontró que la frecuencia de una onda emitida (luz o sonido) y reflejada por un objeto en movimiento era proporcional a la velocidad relativa del objeto (efecto Doppler). Esto ha permitido deducir la velocidad de las partículas de los capilares (hematocrito) aplicando fórmulas de sustracción entre la frecuencia del haz reflejado y la frecuencia del haz emitido (González-Escalada et al., 1999).

El haz emitido puede ser de luz láser, denominándose flujometría de láser doppler, o puede ser ultrasonidos, denominándose ecografía doppler. Persson (1991), en ganado vacuno, encontró que el flujo de sangre en la punta del pezón aumentaba después del ordeño entre 1,8 y 2,6 veces con respecto a momentos antes del ordeño y propuso que la flujometría de láser doppler podía ser un método complementario para determinar el estado de los tejidos del pezón.

En ganado ovino, Piccione et al. (2004) encontraron diferencias en el flujo de sangre antes y después del ordeño de la tarde y de la mañana en ovejas Comisanas, y

concluyeron que la ecografía doppler podía ser una herramienta útil para determinar la actividad de la glándula mamaria.

#### 1.4.2.3. Termografía infrarroja

##### 1.4.2.3.1. Historia de la termografía infrarroja

La historia de la termografía infrarroja (TIR) comenzó en 1800, cuando Sir Willian Herschel descubrió la existencia de radiación infrarroja cuando midió la temperatura de los diversos colores en los que se descompone la luz al pasar por un prisma de Newton (Lahiri et al., 2012). Herschel comprobó que la temperatura iba creciendo desde el violeta hasta el rojo, pero la mayor temperatura se registraba en una zona oscura, fuera del haz visible, más allá del color rojo. Sin embargo fue su hijo, John Herschel, el que grabó la primera imagen térmica de la luz solar (Ring, 2004).

Los primeros detectores de infrarrojos modernos fueron desarrollados para uso militar. El uso médico de la TIR comenzó en el año 1952 en Alemania, cuando los físicos Schwamm y Reeh desarrollaron un detector infrarrojos para registrar imágenes térmicas secuenciales del cuerpo humano (Szentkuti at al., 2011). Aunque algunos autores indican que el uso de la TIR en animales comenzó en la década de los 60 (Harper, 2000), no fue hasta 1971 cuando Stephan y Görlach publicaron los primeros reportes del uso de la TIR en medicina veterinaria.

##### 1.4.2.3.2. Fundamento de la termografía infrarroja

La región del espectro electromagnético conocida como radiación infrarroja (IR) está comprendida entre los 0,7  $\mu\text{m}$  y 1000  $\mu\text{m}$ , aproximadamente, de longitud de onda. La radiación IR viaja a través del espacio a una velocidad conocida como “velocidad de la luz” (300000 km/s) y puede ser reflejada, refractada, absorbida y emitida. Los cuerpos radian energía en función directamente proporcional a su temperatura. Esta radiación es generada por la vibración y rotación propia de los átomos y moléculas que

componen un material. A mayor temperatura el movimiento de estas partículas es mayor, por lo que provoca una mayor radiación de energía.

La TIR se basa en la ley de Stefan-Boltzmann que indica que según aumenta la temperatura de un cuerpo, más cantidad de energía libera y más proporción de esta energía entra dentro del campo visible.

Esta teoría se fundamenta en el comportamiento de un cuerpo negro, el cual es considerado como un objeto ficticio que absorbe toda la radiación que incide sobre él y radia un espectro continuo de energía. En un cuerpo real una fracción de la radiación incidente se absorbe, otra fracción se refleja y otra se transmite, por lo que se tiene que tomar en cuenta la emisividad del mismo. La emisividad de un cuerpo es la relación entre la radiación emitida por un cuerpo real y la radiación que emitiría un cuerpo negro a una misma temperatura y longitud de onda (Lahiri et al., 2012).

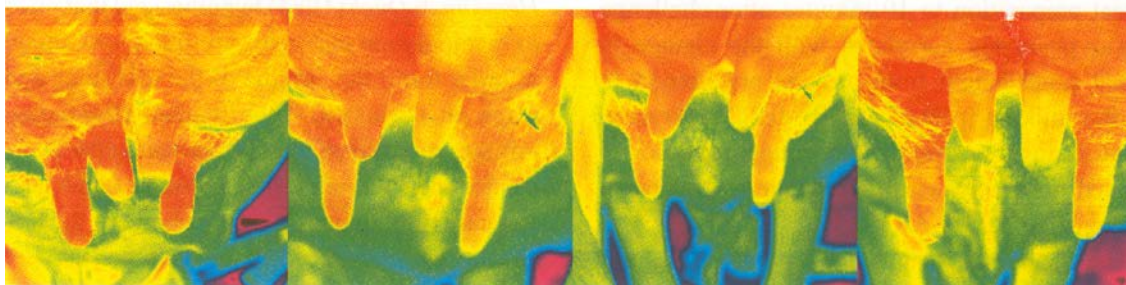
Las cámaras termográficas reciben la energía infrarroja proveniente de un cuerpo, la energía reflejada por dicho cuerpo y la emitida por el ambiente. Esta energía total es recibida a través de un conjunto de lentes sobre un detector de rayos infrarrojos y el detector envía la información electrónica al sensor para procesar la imagen. La información electrónica convierte los datos provenientes del detector en una imagen que puede ser vista en el visor integrado, en un monitor de vídeo estándar o en una pantalla LCD (Balageas, 2007).

#### 1.4.2.3.3. Uso de la termografía infrarroja en medicina veterinaria y ordeño mecánico

La TIR ha sido utilizada con gran éxito en producción animal para determinar la calidad de la carne en cerdos (Schaefer et al., 1989), calidad del semen de toros (Lunstra y Colter, 1997), detectar cambios de temperatura corporal en casos de celo (Hurnik et al., 1985), valorar la existencia de infección (Willard et al., 2007) y estudiar la digestión (Laue y Petersen, 1991). También se ha utilizado para detectar ciertas enfermedades como la diarrea viral bovina en terneros (Schaefer et al., 2004, 2007), laminitis en vacas (Head y Dyson, 2001; Nikkhah et al., 2005).

Relacionado con el ordeño mecánico, en ganado vacuno la TIR se ha utilizado para determinar el efecto del sobreordeño (5 minutos *vs* no sobreordeño y nivel de retirada a 300 g/min) utilizando distintos manguitos (embocadura 5 mm de material blando y suave *vs* embocadura de 30 mm y montados con alta tensión) sobre la temperatura y el tiempo de recuperación del pezón (Paulrud et al., 2005), para estimar el efecto de distintos equipos de ordeño (Vegracht et al., 2007), así como también para comparar el ordeño mecánico con el amamantamiento del ternero a distintas edades (Knizkova et al., 2005). En ganado ovino se ha utilizado para evaluar distintos niveles de vacío (Stelletta et al., 2007). Paulrud et al. (2005) comentan que la integridad de un pezón puede ser controlada comparando su temperatura real o relativa con la temperatura de los pezones adyacentes (Figura 1.1).

Los cambios en la circulación de los fluidos en el pezón producidos por el ordeño mecánico en ganado vacuno, producen un aumento en la temperatura de la piel del pezón que varía entre 0,8 y 2 °C (Hamann y Dück, 1984; Isaksson y Lind, 1994; Paulrud et al., 2005; Vegracht et al., 2007). Este incremento puede ser consecuencia de cambios circulatorios en las paredes del pezón ocasionados por el tratamiento mecánico del pezón en la pezonera (Hamann y Dück 1984) o puede deberse, a) al flujo de leche a través de la cisterna del pezón; b) al hecho de que el pezón al estar dentro de la pezonera disminuya su capacidad de disipar el calor superficial; c) a una respuesta del plexo vascular cutáneo y un aumento del flujo sanguíneo (hiperemia activa) (Isaksson y Lind, 1994).



**Figura 1.1.** Imagen termográfica de ubres de vacuno lechero. Vista posterior, inmediatamente después del ordeño mecánico (Paulrud et al., 2005)

#### 1.4.2.3.4. Uso de la termografía infrarroja para detección temprana de mamitis

La TIR es capaz de detectar incrementos de la temperatura de la piel de la ubre entre 1-1,5 °C (Hovinen et al., 2008) y 2-3 °C (Pezeshki et al., 2011) producidos por mamitis clínica en ganado vacuno. Además, la sensibilidad y especificidad de la técnica para la detección de mamitis subclínica es similar al test de mamitis de California (Polat et al., 2010). Sin embargo algunos autores indican que sólo la TIR puede realizar una detección temprana de mamitis en aquellas infecciones que no produzcan una pronunciada inflamación (Pezeshki et al., 2011). En ovejas lecheras, Castro-Costa et al. (2014) no encontraron diferencias significativas de la temperatura superficial de las ubres en función del estatus sanitario (sanas, mastitis subclínica y mastitis clínica).

#### 1.4.2.4. Cutímetro

El cutímetro (Figura 1.2) se ha utilizado ampliamente para medir los cambios en el espesor de la piel de los animales como respuesta a la prueba de la tuberculina (Hamann y Mein, 1988). Este se compone de una placa fija y otra móvil de 20 x 20 mm (4 cm<sup>2</sup> superficie), unidas por un muelle y conectadas a una escala calibrada con un dial en décimas de milímetro. Los primeros trabajos publicados sobre el uso del cutímetro para estimar el espesor de la punta del pezón se remontan a los años 80 (Schneider, 1981 citado por Isaksson y Lind, 1992; Le Du y Benmederbel, 1984). Posteriormente ha sufrido modificaciones en el muelle para variar la presión ejercida sobre el pezón, variando entre 2,5 kPa (Hamann y Mein, 1990) en vacuno y 30 kPa (Le Du y Benmederbel, 1984) en ganado caprino.

En ganado vacuno, la presión aplicada por el muelle debería estar entre 10-15 kPa (Hamann et al., 1996; Hamann y Mein, 1990), cuando la separación entre las placas es de 10 mm. El valor inferior del intervalo (10 kPa) lo establecen en base a dos aspectos. En primer lugar, dado que la presión intramamaria es inferior a 10 kPa, los cambios que tengan lugar en ésta tendrán poco o ningún efecto sobre la medición del espesor del pezón si la presión que aplica el cutímetro es superior a éste valor. En

segundo lugar, porque a partir de 10 kPa los errores provenientes de pequeños cambios en la superficie de contacto entre el pezón y las placas son mínimos. El valor superior del intervalo (15 kPa), lo justifican porque a partir de este nivel los valores de variación de espesor de las paredes del pezón, obtenidos a diferentes presiones, no llegan a diferenciarse lo suficiente como para que se justifique la aplicación de una mayor presión. Finalmente, estos mismos autores detallan que la superficie de las placas, siempre y cuando esté comprendida entre 200 y 600 mm<sup>2</sup> no afecta significativamente a la precisión y repetibilidad de los resultados.



**Figura 1.2.** Cutímetro utilizado para medir el espesor de las paredes del pezón

Para estimar la variación de espesor del pezón inducida por el ordeño mecánico es necesario medir el espesor del pezón antes y después de haberse producido éste. Según Hamann et al. (1996), ambas mediciones deben realizarse teniendo en cuenta una serie de consideraciones, detalladas a continuación.

Antes del ordeño las medidas deben realizarse antes que la ubre sea manipulada (toque o lave los pezones del animal), ya que la consistencia del tejido disminuye con el estímulo del pezón (Rudovsky et al., 1992) y, además, cuando no exista ninguna contracción visible en el pezón. Estas contracciones rítmicas y longitudinales del pezón pueden ser fácilmente reconocidas, ya que el pezón se vuelve más grueso, más corto y menos comprensible durante 5-10 segundos.

Las medidas tomadas después del ordeño deben realizarse dentro de los 30 segundos posteriores a la retirada de las pezoneras. Igualmente, tras el ordeño, el pezón puede adquirir una forma de cuña como consecuencia del colapso del manguito en la

fase de masaje (Hamann y Mein, 1990). En este caso sería útil realizar la medida después del ordeño tanto en el plano paralelo como en el perpendicular al plano de aplastamiento del pezón (Hamann et al., 1996).

Esta metodología se aplicará antes y después del ordeño permitiendo, de esta forma, determinar la variación del espesor del pezón ( $v_e$ ) como la diferencia entre las lecturas realizadas ( $v_e$ , mm = lectura después de ordeño – lectura antes de ordeño) o en porcentaje (incremento de espesor,  $\Delta\%$ ):

$$(\Delta\%) = \left( \frac{\text{lectura después de ordeño} - \text{lectura antes de ordeño}}{\text{lectura antes de ordeño}} \right) \times 100$$

Los resultados de varios trabajos en los que se han utilizado el cutímetro para estimar el espesor del pezón pueden observarse en el apartado 1.3.1.3.

#### 1.4.2.5. Ecografía

En los últimos años se ha utilizado la técnica del ultrasonido para visualizar las estructuras internas de la ubre y del pezón de los animales. En la actualidad es considerada como una herramienta útil en el estudio del pezón y los cambios producidos en este por el ordeño mecánico. En el siguiente apartado se tratará en profundidad la técnica de la ecografía.

## 1.5. Ecografía

La ecografía o ultrasonografía es una técnica de diagnóstico médico no invasivo que permite la visualización a tiempo real de órganos, tejidos y estructuras anatómicas. Su primera y principal aplicación en las explotaciones ganaderas es el diagnóstico de gestación, aunque en la actualidad la técnica está siendo utilizada, entre otras aplicaciones veterinarias, para la evaluación del estado corporal (Hussein et al., 2013), diagnóstico de posibles patologías genitales (Goddard, 2000) y evaluación de la estructura interna de la ubre (Ayadi et al., 2003) y del estado del pezón, así como de los cambios que en éste puede causar el ordeño mecánico: rutina, componentes y parámetros de la máquina, principalmente (Spencer, 1995; Neijenhuis et al., 2001; Paulrud et al., 2005; Ambord y Bruckmaier, 2010).

Además, la técnica de la ecografía es utilizada con éxito para el diagnóstico no invasivo de causas o lesiones internas del pezón (cuerpos extraños, hematomas, desgarros de mucosa, pólipos, formación de septos, etc.) que afectan a la producción, flujo y extracción de la leche de la glándula mamaria (Hospes y Seeh, 2000; Babkine y Couture, 2002).

La ecografía ofrece la ventaja añadida de que al no emplearse radiación ionizante las exploraciones se pueden realizar de forma repetida sin que se produzcan efectos negativos en la integridad de los tejidos (Lele, 1979).

### 1.5.1. Propiedades de los ultrasonidos

Los ultrasonidos son vibraciones acústicas cuya frecuencia está por encima del límite audible por el oído humano, aproximadamente 20000 ciclos por segundo (20 kHz). Los ultrasonidos se caracterizan por varias propiedades: frecuencia, velocidad y longitud. La frecuencia se define como el número de vibraciones de una fuente de ultrasonidos por unidad de tiempo. La unidad de medida de la frecuencia es el Hertz (Hz) que equivale a una vibración por segundo. Las frecuencias más utilizadas en exploraciones de tejidos se encuentran en el rango de 2 a 10 MHz (1 megahertz (MHz) = 1 millón de vibraciones por segundo) (Nyland et al., 2002). La velocidad de la onda es la velocidad de variación de presión en el medio, el cual depende de las características



del medio (elasticidad y densidad). En los tejidos blandos el promedio de la velocidad de la onda es aproximadamente 1540 m/s, sin embargo en el hueso tiene una velocidad mayor (4080 m/s) y en el aire una velocidad menor (331 m/s) (Gayrard et al., 2010).

La longitud de onda mide la extensión espacial de un ciclo de vibración y está relacionada con la velocidad y la frecuencia (longitud de onda = velocidad / frecuencia). Como la velocidad es constante en los tejidos blandos, a mayor frecuencia menor longitud de onda. La longitud de onda influye en la calidad de la imagen, específicamente en la resolución axial, que es la capacidad de distinguir dos puntos situados en el mismo eje pero a distinta profundidad. Los ultrasonidos son emitidos mediante pulsos de 2 a 3 longitudes de onda, a esto se denomina la longitud espacial del pulso y la resolución axial no puede ser mejor que la mitad de la longitud espacial del pulso.

### **1.5.2. Formación de la imagen**

Los ultrasonidos interactúan con los tejidos que penetran, reflejando una parte y permitiendo que el resto siga penetrando a mayor profundidad. La reflexión produce ecos que resultan en la imagen ecográfica. En ecografía interesa que se refleje una cantidad pequeña de ultrasonidos, pero suficiente como para que pueda ser detectada como un eco, y que la mayor parte consiga penetrar para poder seguir mandando información sobre interfases situadas más profundamente. La reflexión ocurre cuando los ultrasonidos se encuentran con una interfase acústica, la cual es la interface entre dos medios con diferente impedancia acústica. La impedancia acústica describe la mayor o menor resistencia de un medio dado a la penetración de los ultrasonidos y depende de la velocidad de las ondas en el tejido y la densidad del mismo, pero como la velocidad en los tejidos blandos se asume como constante (1540 m/s), la interfase acústica entre dos tejidos blandos se puede estimar por la diferencia en las densidades de los tejidos. La impedancia acústica del aire y del hueso es mucho menor y mayor, respectivamente, que la de los tejidos blandos, por lo que cuando el ultrasonido encuentra una interfase tejido blando/hueso o tejido blando/aire, casi todos los ultrasonidos son reflejados y son muy pocas las ondas que están disponibles para estructuras más profundas (Nyland et al., 2002). De esta forma, la imagen ecográfica se forma a partir de la reflexión producida en las diferentes interfases acústicas entre los tejidos, delimitándose el

contorno interior y exterior de las distintas estructuras y el tiempo de retardo de los ecos determina la distancia de cada punto con respecto a la sonda.

La calidad de las ondas reflejadas depende, entre otros factores, del ángulo formado entre la sonda y el tejido (debe ser lo más perpendicular posible al cambio de medio), de la distancia entre ambos y de la resistencia (impedancia) de los distintos tejidos y medios que forman los órganos y estructuras corporales al paso de las ondas.

El brillo de las diferentes partes de la imagen varía de acuerdo con la intensidad del eco y es conocido como ecogenicidad. La reflexión máxima se produce en las interfases de tejido blando con gas y hueso y se conoce como hiperecogénicas (color blanco), en el otro extremo cuando los ultrasonidos atraviesan estructuras llenas de líquido (cisterna del pezón) en donde no se produce reflexión se conoce como anecogénica (color negro). Las estructuras con ecogenicidad intermedia son representadas de color gris en distintas tonalidades.

### **1.5.3. Componentes de los equipos de ultrasonidos**

Los equipos de ultrasonidos constan de una sonda exploratoria o transductor, que actúa como emisor de ondas y receptor de ecos al mismo tiempo, de una unidad de procesamiento de la señal recibida y de un monitor de visualización de la misma (Figura 1.3). Los diferentes ecógrafos que actualmente se comercializan para diagnóstico médico en animales presentan una resolución alta y muy similar entre ellos, diferenciándose, principalmente, en las prestaciones que ofrecen en cuanto al tratamiento de las imágenes captadas y en el tamaño y peso que poseen. A nivel de campo, son muy prácticos los equipos portátiles ya que por su bajo peso (menos de 2 kg) y su alta autonomía, pueden ser utilizados en cualquier lugar de la explotación, independientemente de donde ésta esté situada.



**Figura 1.3.** Detalle de dos ecógrafos comerciales: (a) portátil; (b) de uso común en clínica veterinaria (Díaz et al., 2004)

La sonda está formada por cristales piezoeléctricos, de cerámica sintética, titanato de bario o zirconato de zinc (González de Bulnes et al., 1999). Estos cristales tienen la propiedad de que al ser sometidos a una corriente eléctrica vibran y producen ultrasonidos, además de interactuar con los ultrasonidos reflejados y generar una corriente eléctrica. Normalmente, el transductor está menos del 1% del tiempo transmitiendo y el resto del tiempo esperando el retorno de los ecos. Un transductor puede emitir ondas sonoras a una única frecuencia o a varias frecuencias. Para ello, estas sondas poseen cristales con diferentes frecuencias de resonancia, lo que permite variaciones en las frecuencias sin cambiar la sonda (Gayrard et al., 2010).

Las sondas que se pueden emplear en ecografía son de tipo mecánico o electrónico. Las sondas mecánicas o sectoriales producen una imagen en forma de triángulo, generalmente con un ángulo de  $90^\circ$ , aunque el ángulo puede cambiar. Estas sondas contienen generalmente un cristal que oscila barriendo un sector. Las sondas electrónicas están compuestas de múltiples cristales (128-256) alineados a lo largo del eje longitudinal de la sonda (Gayrard et al., 2010). Los cristales son activados de forma secuencial y la modificación de la frecuencia de activación permite focalizar los ultrasonidos en distintas profundidades. Las sondas más utilizadas en medicina veterinaria son de tipo lineales y curvilíneas (convex/microconvex). Otra clasificación de las sondas se realiza en función del lugar de exploración: superficiales o transrectales. Las sondas transrectales son más versátiles ya que pueden ser también

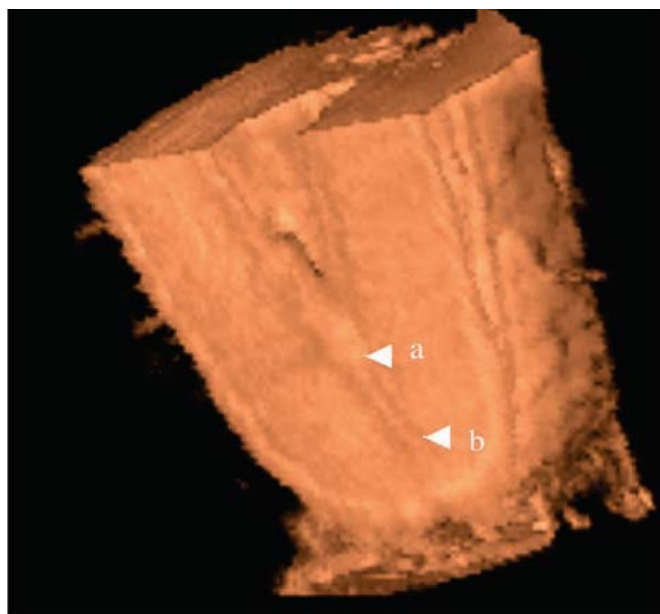
utilizadas de forma superficial, además de ser de tipo lineal, estancas al agua y de pequeño tamaño.

Existen distintos tipos de visualización de los ecos. En los primeros sistemas usados, la intensidad del eco reflejado se representaba en un gráfico en el cual la amplitud de la onda se relacionaba con la intensidad del eco reflejado, a lo cual se le denominó Modo A (Amplitude Mode). Posteriormente, apareció el Modo TM (Time Motion), que se deriva directamente del modo A, y permite determinar el movimiento del eco en función del tiempo. Finalmente, apareció el Modo B (Brightness Mode) en el cual el eco reflejado se representaba en forma de un punto de mayor o menor intensidad, según la amplitud de la onda reflejada. Este modo, ha sido mejorado hasta conseguir tomar imágenes en tiempo real. El transductor es capaz de tomar varias imágenes por segundo por lo que la imagen proyectada en el monitor aparece en movimiento.

#### **1.5.4. Ecografía 3D**

Aunque la ecografía en 3D no es usada frecuentemente en medicina veterinaria, hay algunos reportes de su uso en aplicaciones clínicas de diagnóstico de preñez, examinación del tracto reproductivo y otros usos en animales de compañía, así como su uso en la examinación de la glándula mamaria del vacuno, en especial del pezón (Franz et al., 2004)

Con la ecografía 3D se han obtenido imágenes de buena calidad (Figura 1.4), del parénquima glandular y cisterna del pezón y de algunas delicadas estructuras como el cricoides, la roseta de Fürstenberg y el canal del pezón. Sin embargo, el coste de la técnica varía según la tecnología usada y en algunos casos puede ser prohibitiva.



**Figura 1.4.** Ecografía en 3 dimensiones del canal del pezón (a - roseta de Fürstenberg; b - canal del pezón) (Franz et al., 2004)

#### 1.5.5. Procedimiento de medida recomendado

La exploración de los pezones debe realizarse con el animal de pie (Hospes y Seeh, 2000), siendo la sala de ordeño un lugar adecuado para su realización. Para la exploración es necesario que el pezón esté limpio de pelo y grasa (Franz et al., 2009), sobre todo si es realizada antes del ordeño. Así mismo, es necesario que la cisterna del pezón esté llena de leche. En caso de no ser así, puede provocarse la eyección de la leche mediante la estimulación manual (Weiss et al., 2004), inyección de oxitocina (Seker et al., 2009), o con la infusión de solución salina o leche dentro de la glándula (Dinç, et al. 2000; Santos et al., 2004).

La exploración del pezón puede ser realizada de dos formas distintas, la primera es contacto directo de la sonda con la piel del pezón (Jenninger, 1989; Dinç et al., 2000; Mavrogianni et al., 2004; Fasulkov et al. 2014), siendo de esta forma fácilmente visible la unión entre la cisterna del pezón y la cisterna de la ubre (Franz et al., 2009). La segunda forma es sumergir el pezón en un recipiente lleno de agua y colocar la sonda en contacto directo con la pared exterior del recipiente (Figura 1.5) (Stocker et al., 1989; Will et al., 1990; Saratis y Grunert, 1993; Hamann et al., 1994a; Neijenhuis et al., 2001; Wójtowski et al., 2006; Spanu et al., 2008; Ambord y Bruckmaier, 2010; Ślósarz et al.,

2010; Fasulkov et al., 2014). La interfase del pezón con el agua ayuda a la mejor distinción de las paredes del pezón, además de eliminar la presencia de aire. Estos autores, recomiendan esta técnica tras observar que la colocación de la sonda directamente sobre la pared puede deformar el pezón y alterar las imágenes. El agua debe tener una temperatura próxima a la corporal (37°C) y no estar gasificada (Bruckmaier y Blum, 1992). Algunos autores recomiendan la utilización de una funda de látex rellena de gel de contacto (Babkine y Couture, 2002).



**Figura 1.5.** Exploración ecográfica del pezón utilizando la técnica de la inmersión en agua

El plano de colocación de la sonda puede ser horizontal o vertical (Sendag y Dinç, 1999; Franz et al., 2003; Santos et al., 2004; De Domenico et al., 2006; Fasulkov et al., 2010), aunque para el mejor análisis de las partes del pezón es necesario colocar la sonda paralela al canal del pezón (Dinç et al., 2000; Neijenhuis et al., 2001; Gleeson, 2002; Celik et al. 2008; Franz et al 2009; Seker et al., 2009). Por otra parte, debido a que los pezones no son totalmente circulares, el plano de exploración debe ser el mismo antes y después del ordeño (Neijenhuis et al., 2001; Franz et al., 2003).

La realización de las medidas sobre las imágenes ecográficas se realiza principalmente con el uso de programas informáticos comerciales (Naumann y Fahr 2000; Fahr et al., 2001; Neijenhuis et al., 2001; De Domenico et al., 2006; Wójtowski et al., 2006; Ślósarz et al., 2010) y diseñados específicamente para tal efecto (Gleeson et

al., 2002; 2003; 2004). Para ello las imágenes son grabadas en video a tiempo real y digitalizadas (De Domenico et al., 2006; Wójtowski et al., 2006; Ślósarz et al., 2010). También es posible seleccionar las imágenes durante la exploración y grabar el fotograma elegido (Neijenhuis et al., 2001; Gleeson et al., 2002; 2003; 2004). Otra opción menos automática consiste en realizar medidas directamente sobre las imágenes impresas (Franz et al., 2003; Santos et al., 2004; Klein et al., 2005; Fasulkov et al., 2010) o sobre la pantalla con la ayuda de un pie de rey (Celik et al., 2008).

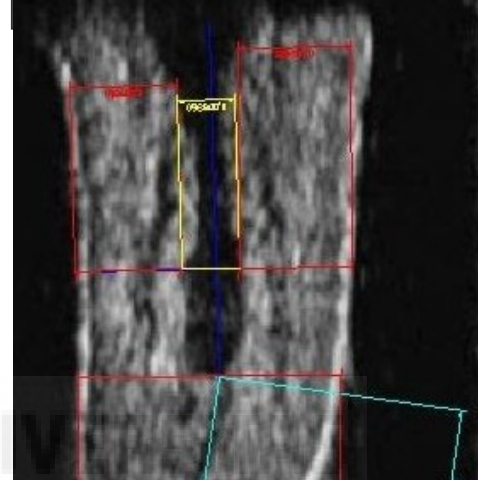
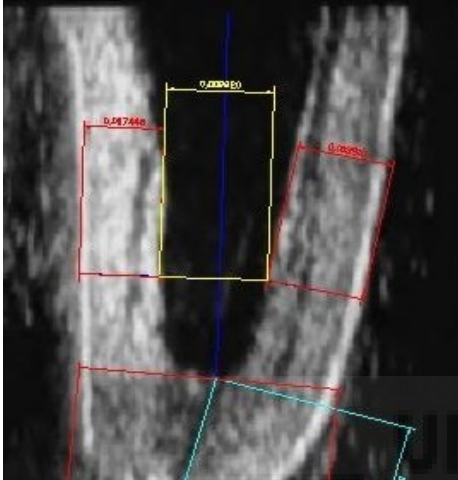
Las variables obtenidas con las distintas formas de medición son las siguientes: longitud del canal del pezón (Neijenhuis et al., 2001; Franz et al., 2003; Celik et al., 2008; Seker et al., 2009); diámetro del canal del pezón (Neijenhuis et al., 2001; Franz et al., 2003); diámetro del pezón a nivel de la roseta de Fürstenberg (Neijenhuis et al., 2001); espesor de la pared del pezón: medido a 1 cm de la roseta de Fürstenberg (Naumann y Fahr, 2000; Fahr et al., 2001; Neijenhuis et al., 2001; Gleeson et al., 2002; Spanu et al., 2008; Seker et al., 2009), medido a 1.5 cm de la roseta de Fürstenberg (Klein et al., 2005) y medido a 2.5 cm de la punta del pezón (Weiss et al., 2004; Ambord y Bruckmaier, 2010) (Figura 1.6). Al igual que con el cutímetro, a partir de las lecturas realizadas antes y después del ordeño puede calcularse la variación de espesor del pezón, expresándola en porcentaje o como la diferencia entre la lectura realizada después y antes del ordeño.

En la Tabla 1.1 se puede apreciar que la frecuencia ecográfica utilizada en la exploración de pezones de cabras y ovejas varía desde 5 MHz hasta 10 MHz. (Bruckmaier y Blum, 1992; Franz et al., 2001; Wójtowski et al., 2006; Fasulkov et al., 2010; Ślósarz et al., 2010). En ganado vacuno, el rango de frecuencias utilizadas va desde 3.5 hasta 10 MHz (Stocker et al., 1989; Dinç et al., 2000; Hospes y Seeh, 2000; Naumann y Fahr, 2000; Neijenhuis et al., 2001; Gleeson et al., 2002; Weiss et al., 2004; Klein et al., 2005; Celik et al., 2008; Seker et al., 2009; Ambord y Bruckmaier, 2010) Las frecuencias inferiores (2 y 3,5 MHz) no se consideran adecuadas para la exploración de pezones (Stocker et al., 1989), y las superiores (10 MHz) se recomiendan para el diagnóstico más exhaustivo de anomalías de la piel o de la capa muscular subcutánea (Hospes y Seeh, 2000).



Antes del ordeño

Después del ordeño



Longitud del canal: 13,4 mm  
 Ancho pezón a final de canal: 23,9 mm  
 Medidas a 1 cm final de canal  
 Ancho pared derecha: 8,9 mm  
 Ancho pared izquierda: 7,4 mm  
 Ancho cisterna: 9,8 mm

Longitud del canal: 16,8 mm  
 Ancho pezón a final de canal: 24,2 mm  
 Medidas a 1 cm final de canal  
 Ancho pared derecha: 10,4 mm  
 Ancho pared izquierda: 9,8 mm  
 Ancho cisterna: 5,4 mm

**Figura 1.6.** Imágenes fotográficas y ecográficas del pezón delantero derecho de una vaca realizadas antes y después del ordeño (Díaz et al., 2004)



Tabla 1.1. Frecuencia de exploración utilizada en ecografías del pezón de vacuno, caprino y ovino.

<b>Autor</b>	<b>Frecuencias (MHz)</b>	<b>Especies</b>	<b>Año</b>	<b>Medidas</b>
Bruckmaier y Blum	5	Vacuno / ovino / caprino	1992	Anatomía interna
Celik et al.	5	Vacuno	2008	TCL
Weiss et al.	5	Vacuno	2004	TCL y TWT
Ambord y Bruckmaier	5	Vacuno	2010	TCL, TWT y TT
Gleeson et al.	7	Vacuno	2002 / 2004	TCL, TWT y TT
Neijenhuis et al.	7,5	Vacuno	2001	TCL, DCP, TWT y TT
Paulrud et al.	7,5	Vacuno	2005	TCL, TWT y TT
Stádník et al.	7,5	Vacuno	2010	TCL, TWT y APP
Pařilová et al.	7,5	Vacuno	2011	TCL, TWT y TT
Klein et al.	8,5	Vacuno	2005	TCL, DCP, TWT y TT
De Domenico et al.	6/8	Vacuno	2006	TCL, TWT y TT
Franz et al.	8,5 / 12	Vacuno / ovino	2001	TCL y DCP
Naumann y Fahr	10	Vacuno	2000	TCL, TWT, APP y TT
Franz et al.	8,5	Ovino	2003	Anatomía interna
Wójtowsky et al	10	Ovino	2006	TCL, DCP y TWT
Fahr et al.	10	Caprino	2001	TCL, TWT, APP y TT
Fasul'kov et al.	5	Caprino	2010	Anatomía interna
Ślósarz et al.	10	Caprino	2010	TCL, DCP y TWT
Fasul'kov et al.	5/ 7,5/ 10	Caprino	2014	Anatomía interna

TCL= Longitud del canal del pezón; TWT = espesor de las paredes del pezón; TT= espesor del pezón;  
DCP = diámetro del canal del pezón; TEWA = área de la punta del pezón.

## **1.6. Efecto de la extracción de leche sobre el estado del pezón**

Los métodos considerados como fisiológicos son: el amamantamiento (Hamann y Osteras, 1994; Gleeson et al., 2002), la extracción mediante cánula o catéter (Hamann y Osteras, 1994; Gleeson et al., 2002) y el ordeño manual (Hamann y Osteras, 1994). Estos métodos pueden servir de referencia para comparar el efecto y la duración de los cambios en los tejidos del pezón debidos a ordeño mecánico.

### **1.6.1. Amamantamiento**

El acto de amamantamiento es cíclico y se divide en dos fases, una activa y otra pasiva (McDonald y Witzel, 1966). Durante la fase activa, el ternero produce vacío en su boca y la lengua presiona la base del pezón contra el paladar para cerrar la vía de circulación entre la glándula y la cisterna del pezón. La presión acumulada en la cisterna del pezón ocasionada por la presión de la lengua a lo largo del pezón hace salir la leche hacia la boca del animal (Rasmussen y Mayntz, 1998). En la fase pasiva la mandíbula y lengua se relajan de nuevo para permitir la recarga del pezón. La mandíbula en su punto más bajo genera el vacío máximo que permite al pezón recuperar completamente su volumen. En este punto, la presión negativa se da en la cisterna del pezón, lo que contribuye a su llenado (Rasmussen y Mayntz, 1998).

La presión negativa en la cisterna del pezón durante el amamantamiento es normalmente inferior a 15 kPa y ocasionalmente se acerca a 20 kPa. Rasmussen y Mayntz (1998) encontraron que la diferencia de presión aplicada durante un amamantamiento es de 16 a 32 kPa, comparable a los valores obtenidos con la máquina de ordeño (30 - 36 kPa). Ahora bien, cuando el ternero ingiere la leche, el vacío en la boca del ternero y en la cisterna del pezón es cercano a cero (McDonald y Witzel, 1966).

Al comienzo y al final de un amamantamiento se producen gradientes inversos de presión (GPI) que corresponden a los GPI que se producen en la puesta y retirada de pezoneras durante el ordeño a máquina (Rasmussen et al., 1994). Este aspecto puede estar relacionado con la transferencia de bacterias a través del canal del pezón. (Rasmussen et al., 1994).

Hamann y Mein (1988) indican que después del amamantamiento del ternero, el espesor de las paredes del pezón disminuye un 25% y retornan a sus valores iniciales a los 15 minutos tras el ordeño. Por otro lado, Knizkova et al. (2005) encontraron que el amamantamiento de los terneros induce una mayor temperatura en los pezones comparados con el ordeño mecánico e indican que el estrés al cual es sometido el pezón depende de la edad de los terneros y de la duración del amamantamiento.

### **1.6.2. Extracción mediante cánula**

La extracción de leche mediante cánula ha sido utilizada para determinar la tasa de secreción de leche en cabras (Henderson y Peaker, 1987). Con la extracción de leche por cánula se obtiene una media del 86% del total del volumen de leche que podría ser esperado de un ordeño manual (Henderson y Peaker, 1987). Una vez insertada la cánula en el interior del pezón a través del canal del pezón, la leche fluye por diferencias de presiones. En el interior de la cisterna del pezón la presión es positiva y mayor que la presión atmosférica, por lo tanto la leche fluye hacia el exterior sin necesidad de ayuda, hasta que las presiones (atmosférica y la presión de la cisterna del pezón) se igualan (Hamann y Mein, 1988).

En ganado vacuno, Hamann y Mein (1990) indican que al drenar la leche vía cánula disminuye la presión intramamaria y se reduce un 3% el espesor del pezón (TT) medido con cutímetro, indicando que los cambios en la presión intramamaria tienen poco efecto sobre las medidas de TT debido a que la presión que ejerce el cutímetro es mayor que la presión intramamaria. Sin embargo, en el caso de la ecografía al no ejercer presión sobre el pezón las medidas sí podrían estar influenciadas por la presión intramamaria. Al respecto, Gleeson et al. (2002) indican que el espesor del pezón, después de la extracción de leche con cánula, es menor comparado con el ordeño mecánico debido a que la presión intramamaria disminuye y los líquidos en la punta del pezón se redistribuyen.

### **1.6.3. Ordeño manual**

Durante el ordeño manual no se aplica vacío sobre los tejidos del pezón y la leche es forzada a través del canal del pezón por el aumento de la presión en la cisterna del pezón. Este aumento de la presión en el interior de la cisterna es producida por el aplastamiento o colapso de la mano sobre el pezón, la cual depende de la facilidad de apertura (dureza) del canal del pezón (Mc Donald y Witzel, 1966).

Gleeson et al. (2002) encontraron un aumento del espesor de las paredes del pezón menor comparado con el ordeño mecánico, indicando que estas diferencias al igual que en el caso de la extracción de leche con cánula, pueden ser debidas a la reducción de la presión intramamaria y a la redistribución de los fluidos en los tejidos del pezón.

### **1.6.4. Ordeño mecánico**

El ordeño realizado en condiciones adecuadas y óptimas produce cambios significativos en los tejidos del pezón (Gleeson et al., 2002), especialmente a nivel de la longitud del canal del pezón, espesor de la punta y de las paredes del pezón (Neijenhuis, et al., 2001). Cuando el ordeño es realizado en condiciones adecuadas estos cambios son de corta duración y reversibles completamente en periodos cortos de tiempo (Isaksson y Lind, 1992). Sin embargo, la realización del ordeño con parámetros no adecuados como niveles de vacío excesivos (Hamann et al., 1993), fallos o ausencia de pulsación (Capuco et al., 1994; Mein et al., 2001), o frecuencias de pulsación elevadas (Hamann y Mein, 1996) así como el sobreordeño (Hillerton et al., 2002), pueden hacer que estos cambios circulatorios persistan o la magnitud de los mismos sea elevada, lo que puede afectar a los mecanismos de defensa locales incrementando el riesgo de nuevas infecciones intramamarias (O'Shea, 1987).

Dentro de los parámetros importantes a tener en cuenta durante el ordeño mecánico nos encontramos al nivel de vacío y la pulsación. El nivel de vacío tiene la función de abrir el canal del pezón y permitir el flujo de la leche desde el pezón, además de sujetar la unidad de ordeño a la glándula. Un nivel de vacío demasiado bajo produciría un aumento en las caídas y deslizamientos de los juegos de ordeño, mientras que un vacío demasiado

alto incrementaría las alteraciones del pezón. Ambas situaciones podrían aumentar el riesgo de infecciones intramamarias (Hamann et al., 1994a). El nivel de vacío utilizado para las cabras y ovejas se encuentra en el rango de 36 a 44 kPa (Le Du, 1989). Los standards internacionales (ISO 5707:2007) aconsejan que el nivel de vacío promedio durante el pico de flujo de leche debe estar entre 28 - 38 kPa en cabras y ovejas, para asegurar que la mayoría de los animales se ordeñarán de manera adecuada en el menor tiempo posible.

Al aumentar el nivel de vacío se incrementa el espesor del pezón (a nivel de la punta) medido con cutímetro. (Hamann et al., 1993). Este incremento puede ser casi inapreciable a niveles de vacío bajos (25 y 30 kPa) o puede llegar a ser del orden de 7-10% y de a 17-25% con niveles de vacío altos (40 y 50 kPa, respectivamente). En ganado caprino, el ordeño con niveles de vacío altos (51 y 52 kPa) aumenta el recuento de células somáticas (Sinapis y Vlachos, 1999).

En ganado ovino, el ordeño con niveles de vacío altos (44 y 50 kPa) produce un nivel de congestión y/o edema en los tejidos del pezón medido con cutímetro mayor que el ordeño a 38 kPa (Sinapis et al., 2006), resultando en un incremento positivo de (1,1% a 4,3%, con 44 y 50 kPa, respectivamente) a diferencia del incremento negativo (-2,9%) con 38 kPa. Sin embargo, Peris et al. (2003b) indican que el nivel de vacío (36 vs 42 kPa) no afecta al espesor del pezón medido con cutímetro ni a la incidencia de nuevas infecciones intramamarias.

Con respecto a la pulsación, la normativa UNE 68048:1998 define a la pulsación como el movimiento de las paredes del manguito, debido el cierre y apertura cíclica del cuerpo del manguito. Este cierre y apertura se denomina ciclo de pulsación y el número de ciclos por unidad de tiempo (minuto) se denomina frecuencia de pulsación. Si el tiempo que permanece abierto el manguito se expresa en porcentaje del tiempo total del ciclo, se habla entonces de relación de pulsación.

En ganado vacuno, Hamann (1990) estudió la variación del espesor de la punta del pezón comparando 3 niveles de vacío (30, 50 y 70 kPa) y 3 velocidades de pulsación (20, 40 y 60 p/min), observando que el incremento de espesor en la punta del pezón, medido con cutímetro, disminuía cuando aumentaba la velocidad de pulsación, y era independiente

del nivel de vacío. En otro experimento, Hamann y Mein (1996) estudiaron la combinación de 3 velocidades (40, 60 y 80 p/min) y 4 relaciones de pulsación (50, 60, 70 y 80%), encontrando que el incremento del espesor del pezón aumentaba a medida que se incrementa la relación de pulsación (50% hasta 80%), así como también las lesiones en los pezones. Además, Hamann y Mein (1996) observan que al aumentar la velocidad de pulsación hasta 80 p/min, el incremento de espesor en la punta del pezón seguía disminuyendo.

Por otra parte, Gleeson et al. (2004) indican que el aumento de la relación de pulsación de 60 a 67 %, en el ordeño de vacas en línea media no produce cambios significativos en el espesor de la pared del pezón ni en la longitud del canal del pezón, estimados mediante ecografía. En ovejas Manchegas, la velocidad de pulsación (120 vs 180 p/min) no tiene efecto sobre el número de nuevas infecciones intramamarias (11 vs 16%), ni en el recuento de células somáticas. Además, tampoco afecta a la variación del espesor de las paredes del pezón (Peris et al., 2003a).

Las características de la pulsación (velocidad y relación de pulsación) tienen una gran influencia en el ordeño de las cabras lecheras, especialmente con referencia al tiempo de ordeño y flujo de leche (Billon et al., 2005). En este sentido, estos autores realizaron un experimento con cabras Saanen y Alpinas, donde se probaron tres velocidades de pulsación (60, 90 y 120 p/min) y dos relaciones de pulsación (50 y 60 %), y se encontró que las distintas combinaciones no afectaron al espesor del pezón después del ordeño ni al recuento de células somáticas. A partir de esos resultados, Billon et al. (2005) recomiendan en cabras Saanen y Alpinas, relaciones de pulsación de 60% y velocidad de pulsación de 120 ppm, de forma que se pueda reducir el tiempo de ordeño sin afectar el espesor del pezón ni aumentar el recuento de células somáticas.

#### 1.6.4.3. Manguitos

El diseño del manguito (diámetro en la embocadura y del cuerpo del manguito y longitud útil del manguito) tiene un mayor efecto sobre los cambios de los tejidos del pezón que otros parámetros de ordeño (características de la pulsación o nivel de vacío) (O'Shea et al., 1984; Gleeson et al., 2004; Mein y Reinemann, 2009), debido a que es el único componente que se encuentra en contacto directo con el animal.

El tamaño del pezón debe determinar el manguito más adecuado (Fernández et al., 1997) y según Mein et al. (2003) debe estar diseñado para:

- Proveer una embocadura y cuerpo de un diámetro que encaje en un rango de formas y tamaños de pezones, de forma que se minimice los deslizamientos de pezoneras y caídas de las unidades de ordeño.
- Proveer una longitud útil a lo largo del cuerpo del manguito que asegure un adecuado masaje a la práctica totalidad de los pezones.
- Ordeñar la mayor cantidad de leche en el menor tiempo posible, minimizando los riesgos de congestión y daños en el pezón.
- Conseguir una limpieza fácil y efectiva.

Mein (1992) comenta que en ganado vacuno el diámetro del cuerpo debería ser 1-2 mm más estrecho que el diámetro medio de los pezones del rebaño, medidos tras la estimulación y antes del ordeño, con el fin de limitar la dilatación de las paredes del pezón en sentido radial, y por tanto la congestión/edema inducida por la máquina. Durante el ordeño, el pezón se alarga entre un 40 y 50 % (Mein et al., 2004) y se expande radialmente para llenar el cuerpo del manguito (O'Callaghan, 2001). En la práctica los manguitos pueden clasificarse en manguitos anchos y estrechos en relación al promedio del tamaño de los pezones en un rebaño (Mein et al., 2004).

Al aumentar el diámetro del cuerpo del manguito se aumenta la penetración del pezón (Hamann et al., 1994b). Además, en los manguitos anchos se produce una expansión adicional acompañada de un alto vacío en la cámara de la embocadura y una mayor flexión del labio del manguito. El aumentar el ancho de la parte superior del cuerpo del manguito de 22 ó 25 mm a 31,6 mm, aumentó la diferencia en el espesor de la pared del pezón medido con ecografía (2,81 mm vs 3,82 mm) (Gleeson et al., 2004). Eitam y Hamann (1993) compararon dos manguitos con diámetros de cuerpo diferentes (21 vs 24 mm) y observaron una mayor congestión/edema en la punta del pezón medido con cutímetro y una mayor incidencia de mamitis en el grupo ordeñado con el diámetro de cuerpo más ancho.

Otra característica importante de los manguitos es la zona efectiva de colapso, en donde la fuerza compresiva o sobrepresión es aplicada sobre el pezón durante la fase

“D” del ciclo de pulsación. Si los pezones son muy cortos o muy largos, en comparación con un manguito, no recibirán el beneficio total de la pulsación, y la congestión generada por el vacío durante la fase de ordeño no se verá disminuida. En ganado vacuno, al principio del ordeño, es necesario que el manguito sea como mínimo 25 mm más largo que el pezón para que, de esa forma, pueda colapsarse por debajo de éste (Hamann et al., 1994b).

Hamann et al. (1994b) compararon manguitos con dos longitudes efectivas diferentes (110-130 mm vs 148 mm), y observaron que las nuevas infecciones intramamarias eran 2 a 3 veces superiores con el manguito de longitud efectiva corta. Resultados similares fueron encontrados por Rønningen y Reitan (1990) al observar que en el 40% y 13% de los pezones delanteros y traseros, respectivamente, la carga compresiva del manguito era insuficiente, como consecuencia de superar la longitud efectiva del manguito. Así mismo, Neijenhuis et al. (2000) observaron un mayor grado de hiperqueratosis en los pezones que sobrepasaban la longitud efectiva del manguito, lo cual ocurrió con mayor frecuencia en los pezones delanteros que en los traseros. En ganado ovino, Fernández et al. (1997) recomiendan manguitos con embocadura de 17 mm para pezones hasta 45 mm de longitud y manguitos con embocaduras de 19 mm para pezones más grandes. Peris et al. (1999) indican que la longitud total del manguito debería ser mayor de 120 mm para el correcto ordeño de cabras de raza Murciano-Granadina.

#### 1.6.4.3.1. Vida útil

Los manguitos acumulan productos derivados de la leche (PDL), especialmente grasa de la leche (Boast et al., 2008) como consecuencia de su uso. Esta acumulación no es igual en todas las partes del manguito de modo que, en ganado vacuno, la mayor concentración de estas sustancias se localiza entre 40 y 60 mm de la embocadura del manguito no encontrándose restos de PDL más allá de 120 mm. Esto se debe, a que la acumulación de la grasa de la leche se produce cuando el manguito se colapsa sobre la leche, la grasa se separa y se va depositando en el manguito, lo cual se ve favorecido con las altas temperaturas durante el lavado (Boast et al., 2003). Además, en estas zonas también se acumula calcio y fósforo (Boast et al., 2008). De esta forma se produce un engrosamiento de las paredes del manguito que influyen en la tensión del cuerpo del



manguito (David et al., 2000), además de una mayor rugosidad en estas zonas debido al depósito de calcio y fósforo que producen un mayor estrés al pezón durante la fase “D” de la pulsación (Boast et al., 2008).

Por otra parte, los manguitos con el tiempo van aumentando la forma ovalada de su cuerpo (la diferencia entre el eje mayor y el eje menor de colapso). Boast et al., (2008) encontraron que después de 2500 ordeños la diferencia entre el eje mayor y eje menor aumentaba en un 3%, que aproximadamente eran 4 mm. De esta forma, se reducía la presión necesaria para colapsar las paredes del manguito. La proporción de pezones enrojecidos se incrementa de tal manera que a los 5000 ordeños hay significativamente más pezones azules o rojos después del ordeño (Boast et al., 2008).

Además de estos cambios, con el tiempo se deforman los labios de la embocadura de los manguitos reduciendo su firmeza (Reinemann et al., 2002). Esta deformación se produce principalmente durante el lavado y las altas temperaturas pueden acelerar la velocidad de la deformación (Boast et al., 2003), lo cual produce un incremento significativo en el número de deslizamientos de manguitos, como consecuencia del pobre sellado entre el pezón y el labio del manguito. Además, los manguitos viejos ven reducido su coeficiente de fricción entre la pared del manguito y la piel del pezón, con lo que es admitido mucho más aire en el manguito y el vacío de ordeño se reduce (Reinemann et al., 2002). Todos estos cambios se traducen en que el manguito se deteriora, el masaje en el pezón se hace cada vez más inefectivo y los pezones están sujetos a un mayor estrés mecánico (Boast et al., 2003).

A partir de 3000 ordeños se puede apreciar diferencias significativas en el rendimiento de los manguitos (Hillerton et al., 2004) similares a los producidos durante fallos en la pulsación, es decir alteraciones en los movimientos de la pared del manguito (Boast et al., 2008). El ordeño con manguitos usados reduce el flujo de leche, aumenta el tiempo de ordeño y aumenta la leche de apurado (Gleeson y O’Callaghan, 1998; Davis et al., 2000; Reinemann et al., 2002; Boast et al., 2003).

#### 1.6.4.3.2. Tensión de montaje y colocación

Los manguitos deben ser diseñados para que encajen en los casquillos perfectamente. Además, la embocadura no debe deformarse y el manguito debe estar lo suficientemente sujeto para evitar que se giren fácilmente sobre su eje (NMC 1998; Reinemann et al., 2001). Sin embargo, es común ver manguitos girados sobre su propio eje en los equipos de ordeño (IDF, 2006). Si los manguitos están mal colocados sobre su eje tienen una gran incidencia sobre la salud del pezón y el ordeño mecánico, por lo que se debe revisar periódicamente el estado y colocación de los manguitos (IDF, 2006).

#### 1.6.4.4. Sobreordeño

El efecto nocivo del sobreordeño ha sido motivo de preocupación desde que se empezó a utilizar el ordeño mecánico en la industria lechera (Natzke et al., 1982), debido a que afecta la condición del pezón y la salud de la ubre (Rasmussen 2004).

Durante el ordeño mecánico, el espesor de las paredes del pezón disminuye en los periodos de alto flujo, y se incrementa en los periodos de bajo flujo y durante el sobreordeño (Isaksson y Lind, 1992). Rasmussen (2004) define al sobreordeño como el momento a partir del cual el flujo de leche desde la cisterna de la ubre a la cisterna del pezón es menor que el flujo de leche a través del canal del pezón. Durante el sobreordeño el nivel de vacío medio en el pezón es mayor debido a que no hay flujo de leche que ayude a disipar el vacío, lo cual si se realiza de forma repetida puede ocasionar daños capilares (Hillerton et al., 2002). Una vez que se produce el sobreordeño, en un tiempo muy corto (10 pulsaciones), el vacío dentro de la cisterna del pezón sigue el mismo patrón del vacío de la curva de pulsación, es decir, vacío muy cercano a cero durante la fase “D” y vacío cercano al vacío de ordeño durante la fase “B” (Rasmussen, 2004).

Además, el vacío de la cámara de la embocadura del pezón aumenta durante el sobreordeño y las fluctuaciones son mayores. Esto produce un aumento en la formación de anillos en la base del pezón, la decoloración del mismo, empeorando la condición del pezón (Hillerton et al., 2002). Además, durante el sobreordeño debido al bajo o

inexistente flujo de leche se produce el gradiente de presión inversa que puede introducir bacterias dentro de la cisterna del pezón (Rasmussen et al., 1994).

Los efectos negativos del sobreordeño pueden verse incrementados cuando el nivel de vacío es excesivo, el masaje a los pezones decrece (Rasmussen, 2004) o el tiempo de sobreordeño se incrementa (Peris et al., 2003b).

En ganado vacuno, Gleeson et al. (2003) indican que un sobreordeño de 5 minutos durante 4 meses produce un mayor daño en la cisterna del pezón y una mayor pérdida de queratina que la retirada de pezoneras cuando el flujo baja de 0,2 kg/min (Gleeson et al., 2003). Sin embargo, en ovejas Manchegas, Molina et al. (1999) observaron que el incremento del tiempo de ordeño progresivo (30 segundos por semana durante 6 semanas) no afectaba al estado sanitario de la glándula mamaria.

El sobreordeño afecta al incremento del espesor de las paredes del pezón, medidos con cutímetro, en ganado vacuno (Isaksson y Lind, 1992) y en ganado ovino (Peris et al., 2003b). Cuando la estimación de los cambios del pezón se ha realizado con el método de la ecografía, los resultados han sido contradictorios. Por un lado, Pařilová et al. (2011), indican que el ordeño con retiradores automáticos ajustados a 100 g/min en vacas produce un alargamiento del canal del pezón comparado con el cese del ordeño a 400 g/min. En este mismo sentido, Paulrud et al. (2005) mencionan que en ganado vacuno el sobreordeño tiende a incrementar el espesor de la pared del pezón. Sin embargo Gleeson et al. (2002) no encontraron diferencias en el espesor de la pared del pezón ni en la longitud del canal del pezón, cuando las vacas se sometieron a 5 y 8 minutos de sobreordeño comparados con la retirada a 200 g/min.

#### **1.6.5. Recuperación del pezón**

Aunque en ganado ovino es habitual realizar dos ordeños, en los últimos años se están realizando numerosos estudios para modificar el intervalo entre ordeños y así disminuir la carga de trabajo (Castillo et al., 2008). En el caso de la raza Murciano-Granadina se suele ordeñar una vez al día (Capote et al., 2008) gracias a su capacidad de almacenaje de leche (Salama et al., 2003). A pesar de ello, la aplicación de 2 ordeños durante los primeros meses de lactación en los animales más productivos es una práctica

que en los últimos años se ha incrementado. Otras razas de ganado caprino como Saanen y Alpina suelen ordeñarse 2 veces al día.

La importancia de conocer el tiempo de recuperación del pezón tras el ordeño consiste en la posibilidad de establecer un intervalo mínimo entre ordeños que permita que los cambios circulatorios en los tejidos del pezón regresen a sus status fisiológico normal (Hamann y Osteras 1994). De lo contrario, se podría producir cambios crónicos irreversibles en los tejidos de las paredes del pezón (Hamann y Osteras, 1994; Neijenhuis et al., 2001).

Los primeros trabajos sobre la recuperación de los tejidos del pezón después del ordeño, se basaron en el grado de penetrabilidad de microorganismos por el canal del pezón (McDonald, 1975; Schultze y Bright, 1983). En ellos se determinó que el diámetro y la penetrabilidad del canal del pezón tienen sus más altos valores después del ordeño, lo que provocaba una mayor facilidad de entrada de bacterias dentro del canal del pezón. Sin embargo, este aumento de la penetrabilidad disminuía a partir de las 2 horas después del ordeño. Además, cuando la máquina de ordeño no funciona adecuadamente se producen alteraciones circulatorias en el pezón que dificultan la capacidad del mismo para mantener cerrado el canal del pezón entre ordeños (Zecconi et al., 2000)

En situaciones prácticas, la determinación de los cambios en los tejidos del pezón es el método más adecuado para estimar la penetrabilidad del canal del pezón. (Neijenhuis et al., 2001). El tiempo de recuperación de los tejidos del pezón depende, entre otros factores, del sistema de ordeño empleado (Hamann y Mein 1990; Gleeson et al., 2002), de la presión ejercida sobre el pezón en la fase “D” del ciclo de pulsación (Spanu et al., 2008) y del tipo de manguito (Paulrud et al., 2005).

De acuerdo con Hamann y Osteras (1994), el tiempo de recuperación del tejido del pezón después del amamantamiento del ternero proporciona una referencia biológica para la evaluación de las reacciones del tejido del pezón al ordeño mecánico, puesto que produce un incremento menor comparado con el ordeño mecánico. Hamann y Mein (1990) indican que el espesor de la pared del pezón medido con cutímetro vuelve a los valores fisiológicos a los 15 minutos en el caso del amamantamiento del ternero, y antes de 1 hora en un ordeño manual, sin embargo este tiempo se prolonga hasta las 4 horas en pezones

ordeñados con equipos de ordeño modificados (pulsación solo en la base del pezón). En ganado vacuno, el espesor de las paredes del pezón (a 1 cm del final del canal del pezón) medido con ecografía, se recupera alrededor de las 4 horas (Neijenhuis et al., 2001; Gleeson et al., 2002). La longitud del canal y el espesor de la punta del pezón (medido al final del canal del pezón) no se recuperan antes de las 5 (Gleeson et al., 2002) y 8 horas (Neijenhuis et al., 2001). Stádník et al. (2010) encontraron que en vacas Holstein y Fleckvieh la longitud del canal del pezón y el espesor de las paredes del pezón no recuperaron sus valores iniciales transcurridas tres horas desde el ordeño.

En el caso de los pequeños rumiantes el tiempo de recuperación del espesor de las paredes y la longitud del canal del pezón tras el ordeño mecánico convencional puede llegar a más de 10 horas en cabras (Ślósarz et al., 2010) y entre las 4 y 10 horas en ovejas (Wójtowski et al., 2006).





## ***2. OBJETIVOS***



El ordeño mecánico puede producir cambios a corto, medio o largo plazo en el estado del pezón. En condiciones adecuadas de ordeño algunos de estos efectos pueden suceder en el pezón sin llegar a tener una mayor trascendencia, sin embargo, cuando el ordeño no se practica correctamente (empleo de rutinas de ordeño incorrectas, mal funcionamiento de la máquina, utilización de parámetros de ordeño y componentes de ordeño no idóneos para la especie ordeñada, etc.), estos efectos se acentúan y afectan a la integridad del pezón, aumentando el riesgo de nuevas infecciones intramamarias. Los cambios a corto plazo están relacionados con la modificación de color, la apertura excesiva del esfínter del pezón y la variación del espesor (congestión/edema) de las paredes en la base y en la punta del pezón. Se ha comprobado que elevadas variaciones positivas o negativas del espesor de la punta del pezón pueden ser un factor predisponente de infecciones intramamarias. Las técnicas no invasivas, más utilizadas para estimar el espesor del pezón son el cutímetro y la ecografía. Sin embargo, la estimación del incremento de espesor de las paredes del pezón, mediante el cutímetro, puede tener la limitación de que se estime, casi exclusivamente, la edematización, ya que la presión ejercida por las placas del aparato fuerza la reevacuación de la sangre acumulada disminuyendo la congestión. La ecografía, sin embargo, ha resultado ser, en los últimos años, una herramienta muy útil en la estimación del espesor de las paredes del pezón en ganado vacuno al poder estimar tanto la congestión como la edematización y ser, además un sistema más rápido de ejecutar. Sin embargo son escasos los trabajos publicados sobre el uso de esta técnica en ganado caprino y ovino.

El objetivo general de esta Tesis Doctoral consiste en estudiar la ecografía como método de estimación de los cambios del espesor del pezón producidos por el ordeño mecánico en pequeños rumiantes. Para ello se han propuesto tres objetivos específicos:

1. Poner a punto la metodología determinando los equipos más adecuados para realizar las exploraciones ecográficas y determinar la frecuencia de exploración óptima, además de comparar la técnica con otros métodos de estimación como son el cutímetro y la termografía. Este objetivo se estudia en los artículos 1, 2 y 3.
2. Estudiar el efecto del ordeño mecánico en el espesor del pezón y el tiempo necesario para la recuperación del pezón tras el ordeño comparando con



métodos considerados fisiológicos (amamantamiento de la cría, extracción con cateter y ordeño manual). Este objetivo se estudia en los artículos 4 y 5.

3. Estudiar el efecto del sobreordeño, el tipo de manguito (manguitos usados en cabras diseñados para ovejas), estado de los manguitos (usados) y colocación (girados 45° sobre sus eje) en el espesor del pezón. Este objetivo se estudia en el artículo 6.





### ***3. MATERIALES Y MÉTODOS***



### **3.1. Granjas experimentales**

#### **3.1.1. Granjas docentes y de investigación de la UMH**

Diecinueve experimentos de los artículos 1, 2, 4, 5 y 6 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) que alberga 250 cabras de raza Murciano-Granadina y 80 ovejas de raza Manchega.

Las instalaciones cuentan con un patio de ejercicio donde los animales tienen acceso durante el día. Cuenta, además, con una sala separada del aprisco de las hembras con capacidad para albergar hasta 10 machos y con una sala de lactancia artificial con condiciones ambientales controladas y con suelo enrejillado de PVC elevado de la solera, la cual está diseñada en pendiente para facilitar la evacuación de residuos orgánicos. Dispone también de lechería, sala de máquinas e instalación de ordeño, totalmente separadas.

La instalación de ordeño cuenta con 1 sala de espera y 1 sala de ordeño 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 Top Flow (Gea Farm Technologies, Bönen – Alemania) (1x12x12) y otra en Línea Alta (LA) que cuenta con 12 juegos de ordeño y ofrece la posibilidad de ser utilizada en las 2 plataformas (2x24x12). Ambos equipos han sido montados por la casa Gea Farm Technologies. La sala cuenta con un amarre de salida rápida frontal y 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 sistema de lectura automática de bolos ruminales montados en unas mangas de manejo situadas a la entrada de los amarres.

El ritmo reproductivo de las cabras llevado a cabo en la granja de la UMH era de 1 parto al año, realizándose el manejo con dos lotes reproductivos. Tras el parto, los cabritos eran separados de la madre de forma que la alimentación de las crías fue de

forma artificial y las madres se ordeñaron mecánicamente una vez al día (9:00 h). En el caso de las ovejas, el ritmo reproductivo es de 3 partos en 2 años con un solo lote reproductivo. Los corderos se mantuvieron con las madres durante 5 semanas, tras lo cual los corderos se destetaron y las madres se ordeñaron mecánicamente 2 veces al día (8:00 h y 17:00 h). La rutina de ordeño empleada era 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 utilizados en la granja de la UMH fueron 40 kPa de nivel de vacío, 90 pulsaciones por minuto y 60% de relación de pulsación para las cabras y 36 kPa de nivel de vacío, 180 pulsaciones por minuto y 50% de relación de pulsación para las ovejas.

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 1205/2005. 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 Micoplasma. 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.

### **3.1.2. Granjas docentes y de investigación de la UPV**

Seis experimentos de los artículos 1 y 2 se realizaron en las instalaciones de la Granja Experimental de Pequeños Rumiantes del Instituto de Ciencia y Tecnología Animal de la Universidad Politécnica de Valencia (UPV) que tiene capacidad para albergar hasta 100 cabras Murciano-Granadinas y 100 ovejas de raza Manchega y Guirra.

Los animales se mantenían en condiciones de estabulación permanente durante todo el año. El ritmo reproductivo llevado a cabo en la granja de la UPV era de 1 parto al

año con un solo lote reproductivo. Tras el parto, los cabritos eran separados de la madre de forma que la alimentación de las crías fue de forma artificial y las madres se ordeñaron mecánicamente una vez al día (8:30 h) durante 6 meses. En el caso de las ovejas, los corderos se mantuvieron con las madres durante 5 semanas, tras lo cual los corderos se destetaron y las madres se ordeñaron 2 veces al día (8:00 h y 17:00 h). La rutina de ordeño empleada era la de “puesta y retirada” con repaso a máquina y sellado de pezones tras el ordeño mediante inmersión en una solución yodada.

La sala de ordeño de la granja experimental de la UPV era de tipo “Casse” con amarre de salida rápida y comedero automático, con dos plataformas de 12 plazas cada una y 6 unidades de ordeño en Línea Media. La pezonera utilizada era de cierre de vacío automático, siendo el manguito de caucho (nitrilo) en las cabras (G50 – DeLaval International AB, Tumba - Suecia) y silicona para las ovejas (S10S - DeLaval International AB, Tumba - Suecia) y la copa de plástico. Las unidades de ordeño tenían un colector (TF80 - DeLaval International AB, Tumba - Suecia) de 100 ml de volumen y cierre manual.

Los parámetros de ordeño utilizados en la granja de la UPV fueron 40 kPa de nivel de vacío, 90 pulsaciones por minuto y 60% de relación de pulsación para las cabras y 36 kPa de nivel de vacío, 180 pulsaciones por minuto y 50% de relación de pulsación para las ovejas.

La granja docente de la UPV cumple las normas sobre protección de animales utilizados en experimentación animal y otros fines científicos descritas en el RD 1205/2005. La granja de la UPV también 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 y está libre de enfermedades de declaración obligatoria.

### **3.1.3. Granja comercial Pomares (Crevillente – Alicante)**

El experimento del artículo 3 se realizó en las instalaciones de la Granja Comercial Pomares, ubicada en el término municipal de Crevillente – Alicante. Esta granja tiene una capacidad para 1200 cabras Murciano-Granadinas.

Los animales se mantenían en condiciones de estabulación permanente durante todo el año. El ritmo reproductivo llevado a cabo en la granja Pomares era de 1 parto al año en distintos lotes reproductivos. Tras el parto, los cabritos eran separados de la madre de forma que la alimentación de las crías fue de forma artificial y las madres se ordeñaron mecánicamente una vez al día (7:00 h). La rutina de ordeño empleada era la de “puesta y retirada” con repaso a máquina y sellado de pezones tras el ordeño mediante inmersión en una solución yodada.

La sala de ordeño de la granja Pomares era de tipo “Casse” con amarre autoblocante de desplazamiento frontal y comedero automático, con dos plataformas de 24 plazas cada una, 48 unidades de ordeño en línea baja (2x24x48). La pezonera utilizada era de apertura y cierre automático de vacío, siendo el manguito de silicona (Top Flow Z- Gea Farm Technologies, Bönen - Alemania).

Los parámetros de ordeño utilizados en la granja Pomares fueron 40 kPa de nivel de vacío, 90 pulsaciones por minuto y 60% de relación de pulsación.

La Granja Pomares 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 y está libre de enfermedades de declaración obligatoria.

### **3.1.4. Granja comercial vacuno lechero (Orihuela – Alicante)**

Un experimento del artículo 1 se realizó en las instalaciones de una granja comercial de ganado vacuno ubicada en el término municipal de Orihuela – Alicante. La granja contaba con 40 vacas Holstein en estabulación libre. La configuración de la sala de ordeño era en espina de pescado 30°, con 2 plataformas, 5 plaza cada una y 10

unidades de ordeño en Línea Baja (2x5x10). La unidad de ordeño estaba compuesta por un colector de 300 mL (Classic 300 - Gea Farm Technologies, Bönen – Alemania), copa de acero inoxidable y manguito de silicona (ClassicPro- Gea Farm Technologies, Bönen – Alemania). Los parámetros utilizados fueron 42 kPa de nivel de vacío, 60 pulsaciones por minuto y 60% de relación de pulsación.

La rutina pre-ordeño consistió en el lavado de los pezones con agua templada, secado con toallas de papel seguido de la eliminación de los primeros chorros. Posteriormente, se colocaban las pezoneras y tras el ordeño se retiraban con apurado a máquina. Después de la retirada de las pezoneras se sumergían los pezones en solución yodada.

### **3.2. Metodología seguida para la medición del espesor del pezón.**

#### **3.2.1 Cutímetro**

Para esta prueba se utilizó un cutímetro (N° 33865; Hauptner, D-42651 Solingen), equipado con un muelle que ejercía una fuerza de 6.7 N. El espesor del pezón se definió como la distancia (cm) entre las placas del cutímetro después de aplicar la presión sobre la punta del pezón. Para estimar el espesor del pezón con el cutímetro se siguió la metodología propuesta por Hamann et al. (1996), además, las medidas se realizaron por duplicado de forma que tras la primera aplicación se abrió el cutímetro y se volvió a repetir la medición sin cambiar la posición del aparato (Isaksson and Lind, 1992). El valor promedio de estas dos medidas fue considerado como el valor de espesor del pezón (TT).

#### **3.2.2 Ecografía**

Para la realización de las ecografías se utilizó un ecógrafo portátil (Agroscan AL, ECM, Noveko International Inc., Francia), equipado con 3 sondas lineales intercambiables: sonda rectal bifrecuencia de 5 y 7,5 MHz (ALR 575); sonda abdominal de frecuencia 10 MHz (ALA 100); sonda abdominal de frecuencia 3,5 MHz (ALR 350). Para realizar la exploración se utilizó un recipiente de plástico transparente de 53 mm de diámetro y 80 mm de altura lleno de agua a 37°C. El agua se intercambiaba cada



tres animales o antes si había muchas partículas en suspensión. Por otro lado, para mejorar la calidad de las imágenes, la sonda se colocó dentro de una bolsa de látex (Control Forte, Artesana España, SAU, España) rellena de gel de contacto (TRANSONIC-GEL, Telic, S.A., España) y se aplicó gel de contacto entre la bolsa de látex y el recipiente. La sonda se colocó en un plano vertical, paralela al eje longitudinal del pezón, siendo el mismo tanto antes como después del ordeño.

Las imágenes ecográficas obtenidas se grabaron en una cinta de video y se digitalizaron con el programa Windows Movie Maker 2.6 (Microsoft Corporation, USA). De la grabación obtenida se eligió la mejor imagen (fotograma) de cada glándula que posteriormente era insertada en una hoja de AutoCAD 2000 (Autodesk, Inc, USA) (experimentos de los artículos 1 y 2) o en el programa informático ECOPEZON<sup>®</sup>, para realizar las medidas correspondientes (Figura 3.1):

Espesor de la pared del pezón (TWT): se trazaron 2 líneas por el eje medio de las dos paredes del pezón y a 1 cm en cabras y a 1,5 cm en ovejas se trazó una línea perpendicular a esta, se midió el ancho (cm) de cada pared (superior e inferior) y se obtuvo el valor promedio de ambas medidas.

$$TWT = (A1 + A2)/2$$

Área de las paredes (TWA, cm<sup>2</sup>): comprendía el área que abarca las dos paredes (superior e inferior) hasta la distancia de 1 ò 1,5 cm de la punta del pezón, incluida la punta del pezón.

$$TWA = B + C$$

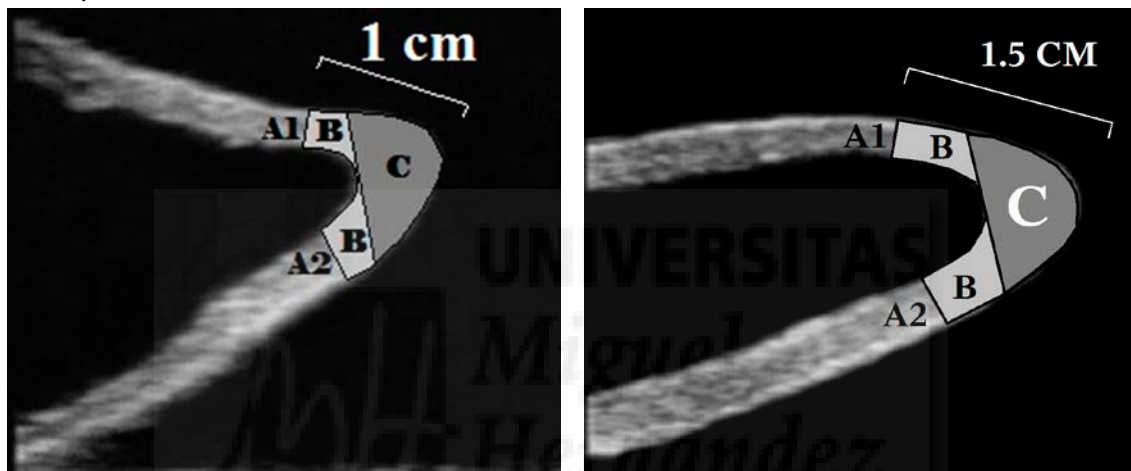
Área de la punta del pezón (TEWA, cm<sup>2</sup>): era el área que abarcaba desde el extremo interior del canal del pezón hasta el extremo exterior del canal del pezón.

$$TEWA = C$$

Longitud del canal del pezón (TCL, cm): Aunque en una gran parte de las ecografías no se apreciaba el canal del pezón, el programa ECOPEZON<sup>®</sup> podía estimar

la longitud del canal del pezón midiendo la distancia desde la punta del pezón hasta el final de la cisterna del pezón (extremo exterior e interior del canal del pezón, respectivamente).

Las exploraciones ecográficas se realizaron en la glándula derecha de cada animal, justo antes de colocar las pezoneras e inmediatamente después de su retirada de los pezones. La elección de las imágenes ecográficas (fotograma) a estudiar y la realización de las medidas fueron hechas siempre por el mismo operario, excepto en la prueba en la que se estudió el efecto del operario en la elección de las mismas.



**Figura 3.1.** Medidas realizadas en las imágenes ecográficas en cabras (izquierda) y ovejas (derecha).

Las medidas fueron almacenadas en una hoja de cálculo de Excel o almacenadas por el programa ECOPEZON® y exportadas a una hoja de cálculo de Excel. A partir de estas medidas, se obtuvieron las diferencias de espesores y áreas, determinándolas como la diferencia entre la medida después del ordeño menos la medida antes del ordeño.

$$\text{Diferencia (D)} = \text{Después del ordeño} - \text{Antes del ordeño}$$

Además se obtuvieron los incrementos de espesor y áreas, expresados en porcentaje, mediante la fórmula siguiente:

$$\text{Incremento (I)\%} = \frac{\text{Medida después del ordeño} - \text{Medida antes del ordeño}}{\text{Medida antes del ordeño}}$$

### **3.3 Diseño experimental y análisis estadístico**

El diseño experimental, variables medidas y análisis estadísticos se detallan en cada uno de los artículos recogidos en esta Tesis Doctoral.





## ***4. PUBLICACIONES***



**4.1. Use of ultrasound scanning to estimate teat wall thickness in Murciano-Granadina goats.**

Diaz, J.R., Alejandro, M., Peris, C. y Fernández, N.

Livestock Science, 2013 - 155: 114-122.

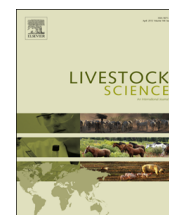
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.livsci.2013.04.007>





Contents lists available at SciVerse ScienceDirect

## Livestock Science

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/livsci](http://www.elsevier.com/locate/livsci)

# Use of ultrasound scanning to estimate teat wall thickness in Murciano-Granadina goats

J.R. Díaz<sup>a,\*</sup>, M. Alejandro<sup>a</sup>, C. Peris<sup>b</sup>, N. Fernández<sup>b</sup>

<sup>a</sup> Departamento de Tecnología Agroalimentaria, Escuela Politécnica Superior de Orihuela, Universidad Miguel Hernández, Ctra. Beniel, Km. 3.2, 03312 Orihuela, Spain

<sup>b</sup> Instituto de Ciencia y Tecnología Animal, Universidad Politécnica de Valencia, Camino de Vera s/n., 46022 Valencia, Spain

## ARTICLE INFO

## Article history:

Received 9 January 2013  
Received in revised form  
12 April 2013  
Accepted 14 April 2013

## Keywords:

Teat condition  
Teat thickness  
Cutimeter  
Ultrasonography  
Milking

## ABSTRACT

To evaluate the ultrasound technique as a method for estimating the effect of mechanical milking on teat thickness in Murciano-Granadina goats, the following work was carried out with a twofold objective: (1) to study the most suitable ultrasound exploration frequency for this breed and the effect of the operator in applying the technique and (2) to validate the approach, comparing it with measurements taken by another estimation method (cutimeter) and performing ultrasound examinations in cows using the same methodology. To this end, three studies were designed. In the first study, 2 experiments were carried out: (a) the first (E1) tested the frequencies 5, 7.5 and 10 MHz; (b) the second (E2) tested the frequencies 3.5 and 5 MHz. In the second study, 2 different independent operators (OP) performed sonography on the same animals (E3), chose the best image of ultrasound examinations recorded as a video sequence (E4) and carried out measurements on ultrasound images (E5). In the third study, the technique tested in goats was applied in 10 Holstein cows (E6) and, finally, ultrasound scans were performed at 5 MHz frequency and cutimeter measurements taken in 63 goats (E7).

The following variables were measured in the ultrasound scans: teat wall thickness (TWT), teat wall area (TWA) and teat end area (TEWA). The cutimeter was also used to measure teat wall thickness (TT).

From the results obtained, we observed that frequencies of 5 and 7.5 MHz were the most suitable to estimate the teat wall changes brought about by mechanical milking. Moreover, applying the same methodology and frequencies in Holstein cows, the results achieved were similar to those published in the bibliography and the variables measured (TWT, TWA and TEWA) presented a high and significant correlation ( $R=0.62$ ) with the variable (TT) measured by cutimeter. OP experience had an effect on TEWA before milking in all three experiments (E3–E5) and in TWT, TWA and TEWA after milking in E4 and E5. Despite the effects observed for some variables before and after milking, a significant effect was only found for the difference (after–before milking) in TEWA in E3 and TWT in E4.

The ultrasound technique used can serve as a useful tool to evaluate teat wall thickness changes caused by mechanical milking in goats. Nevertheless, it would be appropriate to carry out another study to develop IT tools to minimise the operator effect in the measurement of ultrasound variables.

© 2013 Elsevier B.V. All rights reserved.

## 1. Introduction

Mechanical milking can cause teat status changes in the short, medium or long term (Mein et al., 2001). Short term changes are related with colour modification, excessive

\* Corresponding author. Tel.: +34 966749707; fax: +34 966749677.  
E-mail address: [jr.diaz@umh.es](mailto:jr.diaz@umh.es) (J.R. Díaz).



opening of the teat sphincter and variation in the thickness (congestion/oedema) of the walls at the teat base and end (Mein et al., 2003). The importance, extent and persistence of the variation in teat wall thickness will depend on the milking duration and the conditions in which it was carried out (Hamann and Mein, 1990).

It has been found that high positive (greater thickness after than before milking) or negative (lower thickness after than before milking) variations in teat end thickness ( $> +5\%$  and  $> -5\%$ ) can be a predisposing factor for intramammary infections (Zecconi et al., 1996), as the efficiency of local defence mechanisms may be affected (Hamann and Osteras, 1994). In goats, Fahr et al. (2001) observed that animals with a somatic cell count (SCC) of over 1 million cells/mL presented a greater teat wall thickness compared to those with a lower SCC when measured with cutimeter both before (5.09 mm vs 4.75 mm) and after milking (5.16 mm vs 4.88 mm).

The non-invasive techniques most widely used in cattle to estimate the changes in teat tissues due to mechanical milking are the cutimeter (Hamann et al., 1996), ultrasonography (Neijenhuis et al., 2001) and infrared thermography (Paulrud et al., 2005). Several authors (Hamann and Mein, 1988; Isaksson and Lind, 1992) have established that, in cows, the cutimeter can be used to determine slight changes in teat and thickness with a high degree of accuracy ( $\pm 2\%$ ) and repeatability ( $r=0.99$ ). The cutimeter has been applied in goats to estimate the variation in teat end thickness due to mechanical milking and study in greater depth its relation with other morphological characteristics of the teat (Skapetas et al., 2008), the effect of milk pipeline height (Manzur et al., 2012) and its relation with udder health status (Fahr et al., 2001). This method, by exerting pressure on the teat, could be estimating oedematisation but might be underestimating the congestion caused by machine milking (Hamann and Mein, 1990).

Sonography is a useful tool to assess the changes in teat tissue (congestion and oedema) due to mechanical milking. The exploration frequencies used in bovine varied from 5 to 8.5 MHz (Ambord and Bruckmaier, 2010; Glesson et al., 2002; Hospes and Seeh, 2000; Klein et al., 2005; Neijenhuis et al., 2001). In goats, frequencies of 5 MHz (Fasulkov et al., 2010) and 10 MHz (Fahr et al., 2001; Ślósarsz et al., 2010) have been used to estimate the changes brought about in the teat by machine milking, achieving good repeatability. However, some authors point out that the repeatability of the ultrasound method in cows and goats is related with the practical experience of the operator (Klein et al., 2005), as less ample experience significantly affects the measurements (Ślósarsz et al., 2010).

To assess the ultrasound technique as a method for estimating the effect of machine milking on teat thickness in Murciano-Granadina goats, the following work was carried out with a dual objective: (1) to study the most suitable ultrasound exploration frequency for this breed and the effect of the operator in applying the technique; (2) to validate the approach by comparison with measurements taken by another estimation method (cutimeter) and performing ultrasound examinations in

cattle using the same methodology, to determine whether the results obtained were similar to those published by other authors.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Animals, housing and management

The trials were carried out on 3 farms: the Educational and Research Farm of the Escuela Politécnica Superior de Orihuela (EPSO) at the Miguel Hernández University (UMH); Experimental Farm of the Instituto de Ciencia y Tecnología Animal (ICTA) at the Universidad Politécnica de Valencia (UPV); and a commercial dairy farm located in Orihuela (Alicante province, Spain).

The UMH farm herd consists of 200 Murciano-Granadina breed goats. During experiments, animals were kept in free stall housing, with daytime access to the exercise yards. The farm's reproduction rate was one partum/year. The kids were fed artificially from birth, while the goats were milked mechanically once daily, always in the mornings. The milking parlour was "Casse" type with a quick exit stalls, two platforms of 12 places each and 12 low-line milking units ( $1 \times 12 \times 12$ ). The milking machine had electronic milk recorders and teatcups with automatic vacuum shut-off valve and silicon liners (Top Flow Z) (Gea Farm Technologies, Bönen, Germany). The milking parameters used were: rate of 90 pulsations per minute, vacuum level of 40 kPa and a 60% pulsation ratio.

The UPV farm is capable of housing up to 100 Murciano-Granadina breed goats, and during the experiments the animals were stabled in permanent housing conditions. The kids were fed artificially from birth, while the goats were machine milked once daily in the morning. The milking parlour was "Casse" type with quick exit stalls, 2 platforms with 12 places each and six midline milking units ( $2 \times 12 \times 6$ ). The milking units consisted of a claw (SG-TF80 ML) by manual shut-off key and the teatcup had automatic shut-off by system valve and rubber liner (Almatic G50, DeLaval International AB, Tumba, Sweden). The milking parameters used were: rate of 90 pulsations per minute, vacuum level of 40 kPa and a 60% pulsation ratio.

On both farms, the machine milking routine for the animals consisted of teatcup placing, mechanical milking and teatcup removal. Finally, after milking teats were immersed in an iodine solution.

The commercial dairy farm had 40 Holstein cows housed in free-stall barn. The milking parlour was herringbone ( $30^\circ$ ), with 2 platforms, 5 places each and 10 low-line milking units ( $2 \times 5 \times 10$ ). The milking unit was composed of a 300 mL clow (Classic 300), stainless steel teatcup and silicon liner (ClassicPro) (Gea Farm Technologies, Bönen, Germany). The milking parameters used were: rate of 60 pulsations per minute, vacuum level of 42 kPa and a 60% pulsation ratio. Pre-milking routine consisted of washing the teats with warm water and drying with paper towels followed by forestripping. Next, the teatcups were attached then removed after milking with machine stripping. Following teatcup removal, the teats were immersed in iodine solution.

## 2.2. Experimental design and data processing

To achieve the stated aims, three studies were carried out:

- Exploration frequencies study.
- Study of operator effect in application of the technique.
- Method validation study: comparison with cutimeter and ultrasound examination in cows.

### 2.2.1. Exploration frequencies study

Two experiments were performed in this trial. The first (E1) was carried out at the UPV farm and 25 animals were used from different parity number (3rd to 6th parity). The second experiment (E2) was carried out at the UMH farm and 55 animals from different parity numbers were used (2nd to 5th partum). The animals were in their third month of lactation in both experiments. Ultrasound scans were performed before and after milking on 2 consecutive days.

The frequencies before and after milking in E1 were applied in the following order: the bi-frequency probe was fitted first (5–7.5 MHz), initially performing the ultrasound scan at 5 MHz frequency, before changing to 7.5 MHz frequency; the 10 MHz abdominal probe was then fitted and the sonographic exploration carried out at this frequency.

E2 set out using the 5 MHz frequency before examining the teats at a frequency of 3.5 MHz.

### 2.2.2. Study of operator effect in application of the technique

Three experiments were designed for this trial: the first (E3) was carried out on the UPV farm and 46 animals were used from different parity numbers (1st to 4th partum). Two different operators, one well versed in performing examinations (OP1) and the other inexperienced (OP2), carried out ultrasound scans on the right gland of the same animals before and after milking, using a frequency of 5 MHz. To this end, before and after milking OP1 performed the scans first, which were then carried out immediately afterwards by OP2. OP1 was responsible for selecting the sonographic images and measurements.

In the second experiment of this study (E4), we used videos of ultrasound scans of 25 animals taken before and after milking at a frequency of 5 MHz by OP1. In this stage, 2 different operators, one with broad experience (OP1) and another inexperienced (OP2), were asked to view the video and select the most suitable image or frame. OP1 subsequently carried out the measurements on all the images.

In the third experiment (E5) of this study, we used sonographic images extracted from a video recording of 25 goats taken before and after milking at a frequency of 5 MHz by OP1. These frames were measured in AutoCAD 2000 (Autodesk, Inc, USA) by 2 different operators, one with ample experience (OP1) and another inexperienced (OP2) in the measurements.

### 2.2.3. Method validation study: comparison with cutimeter and ultrasound examination in cows

Two experiments were designed in this study. The aim of the first (E6) was to determine whether the examination and measuring method developed for goats correctly

estimated the thickness variation caused by machine milking and if the measurements were similar to those reported by other authors. For this purpose, ultrasound teat scans were performed in 10 Holstein cows in different parity number and lactation stage. Scans were performed before and immediately after milking on each animal, using two frequencies: 5 and 7.5 MHz.

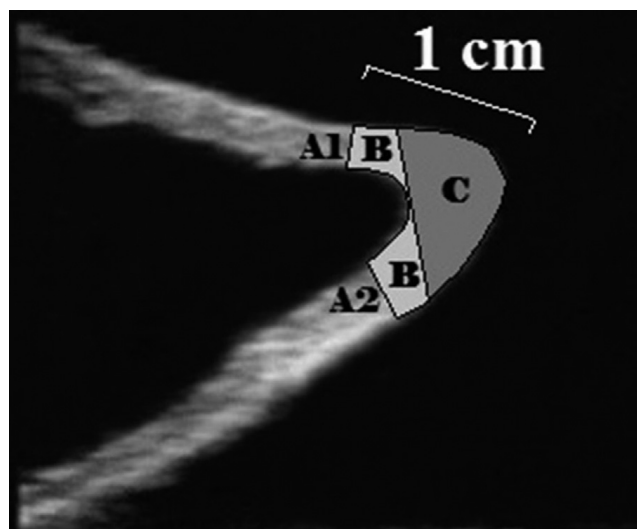
The second experiment in this study (E7) was carried out on the UPV farm using 63 goats (4th month of lactation) with different parity number. Ultrasound scans were performed on 2 consecutive days at 5 MHz frequency and measuring TT with the cutimeter, before and immediately after machine milking, in the right gland of each animal. Scans were first performed on the teat and TT was then measured with the cutimeter.

## 2.3. Ultrasound scans

A portable ultrasound unit (Agroscan AL, ECM, Novoko International Inc., France) was used for the scanning, equipped with 3 interchangeable linear probes: bi-frequency rectal probe at 5 and 7.5 MHz (ALR 575); abdominal probe at 10 MHz frequency (ALA 100); abdominal probe at 3.5 MHz frequency (ALR 350). For the examination, a transparent plastic recipient 53 mm in diameter and 80 mm in height was used, filled with water at 37 °C. The water was changed every three animals or previously if there were many particles in suspension. Moreover, to improve the image quality, the probe was placed inside a latex bag (Control Forte, Artsana Spain, SAU, Spain) filled with contact gel (TRANSONIC-GEL, Telic, S.A., Spain) and contact gel was applied between the latex bag and the recipient. The probe was placed in a vertical plane parallel to the longitudinal axis of the teat and kept the same before and after milking.

The sonographic images obtained were recorded on videotape and digitally scanned with the programme Windows Movie Maker 2.6 (Microsoft Corporation, USA). The best image (frame) of each gland was selected from the recording and inserted in an AutoCAD 2000 (Autodesk, Inc, USA) sheet to make the corresponding measurements (Fig. 1). (a) Teat wall thickness (TWT): 2 lines were traced along the middle axis of the two teat walls and at 1 cm a line was drawn perpendicular to it, measuring the width (cm) of each wall (upper and lower) to obtain the mean value of both measurements; (b) wall area (TWA, cm<sup>2</sup>): the area covering both walls (upper and lower) to a distance of 1 cm from the teat end, including the teat end; (c) teat end area (TEWA, cm<sup>2</sup>): the area from the inner to the outer end of the teat canal. For ultra-sound scans in cows, the measurements were taken 2 cm from the teat end and the teat canal length was measured (TCL, cm).

Ultrasound scans were performed in the right gland of each animal just before the teatcup attachment and immediately following their removal. Selecting the sonographic images (frames) to be studied and the measurements taken was always done by the same operator, except in the trial studying the effect of the operator in choosing the images (E5).



**Fig. 1.** Measurements on ultrasound image: teat wall thickness,  $TWT=(A1+A2)/2$ ; Teat wall area,  $TWA=B+C$ ; teat-end wall area,  $TEWA=C$ .

#### 2.4. Cutimeter

For the cutimeter trial, a spring-load calliper (N° 33865; Hauptner, D-42651 Solingen) was used, equipped with a spring exerting a force of 6.7 N ( $400 \text{ mm}^2$ ,  $0.01675 \text{ N/mm}^2$ ). Teat thickness (TT) was defined as the distance (cm) between the cutimeter jaws after applying the pressure to the teat end. To estimate the TT with the cutimeter, we followed the methodology put forward by Hamann et al. (1996). Moreover, the measurements were also taken in duplicate; after the first application, the cutimeter was opened and the thickness gauged again without changing the device's position (Isaksson and Lind, 1992). The mean of these two measurements was the TT value considered.

Teat scans and cutimeter measurements were performed before and after milking, to determine the variation in teat thickness (ve) caused by milking as the difference between the readings taken (ve,  $\text{cm} = \text{post-milking reading} - \text{pre-milking reading}$ ).

#### 2.5. Statistical analysis

The association between the explanatory variables and ultrasonography variables was assessed using a stepwise linear mixed model procedure (MIXED, SAS Institute Inc, V.9.1. 2002). The final models included teat wall thickness (TWT) and areas (TWA and TEWA measured before and after milking and their differences) as outcome variable and the following factors:

In the examination frequency studies (E1 and E2), the data were analysed separately for the values taken before and after milking and for the difference obtained from the previous values.

**E1.** fixed effect of frequency ( $F$ , 3 levels: 5, 7.5 and 10 MHz), fixed effect of date ( $D$ , 2 levels: day 1 and day 2), random effect of animal ( $A$ , 25 levels: 1,2,3....25).

**E2.** fixed effect of frequency ( $F$ , 2 levels: 5 and 3.5 MHz), fixed effect of date ( $D$ , 2 levels: day 1 and day 2), random effect of animal ( $A$ , 55 levels: 1,2,3....55).

The association between the explanatory variables and ultrasonography variables at E3–E6 was assessed using a general linear model procedure (ANOVA, SAS Institute Inc, V.9.1. 2002).

**E3.** operator effect (OP, 2 levels: 1 and 2) and animal effect ( $A$ , 46 levels: 1,2,3....46).

**E4.** operator effect (OP, 2 levels: 1 and 2) and animal effect ( $A$ , 25 levels: 1,2,3....25).

**E5.** operator effect (OP, 2 levels: 1 and 2) and animal effect ( $A$ , 25 levels: 1,2,3....25).

**E6.** frequency effect ( $F$ , 2 levels: 5 and 7.5) and animal effect ( $A$ , 10 levels: 1,2,3....10).

The relationship between teat thickness as measured by sonography and cutimeter (E7) was studied using the coefficient of correlation (PROC CORR, SAS Institute Inc, V.9.1., 2002).

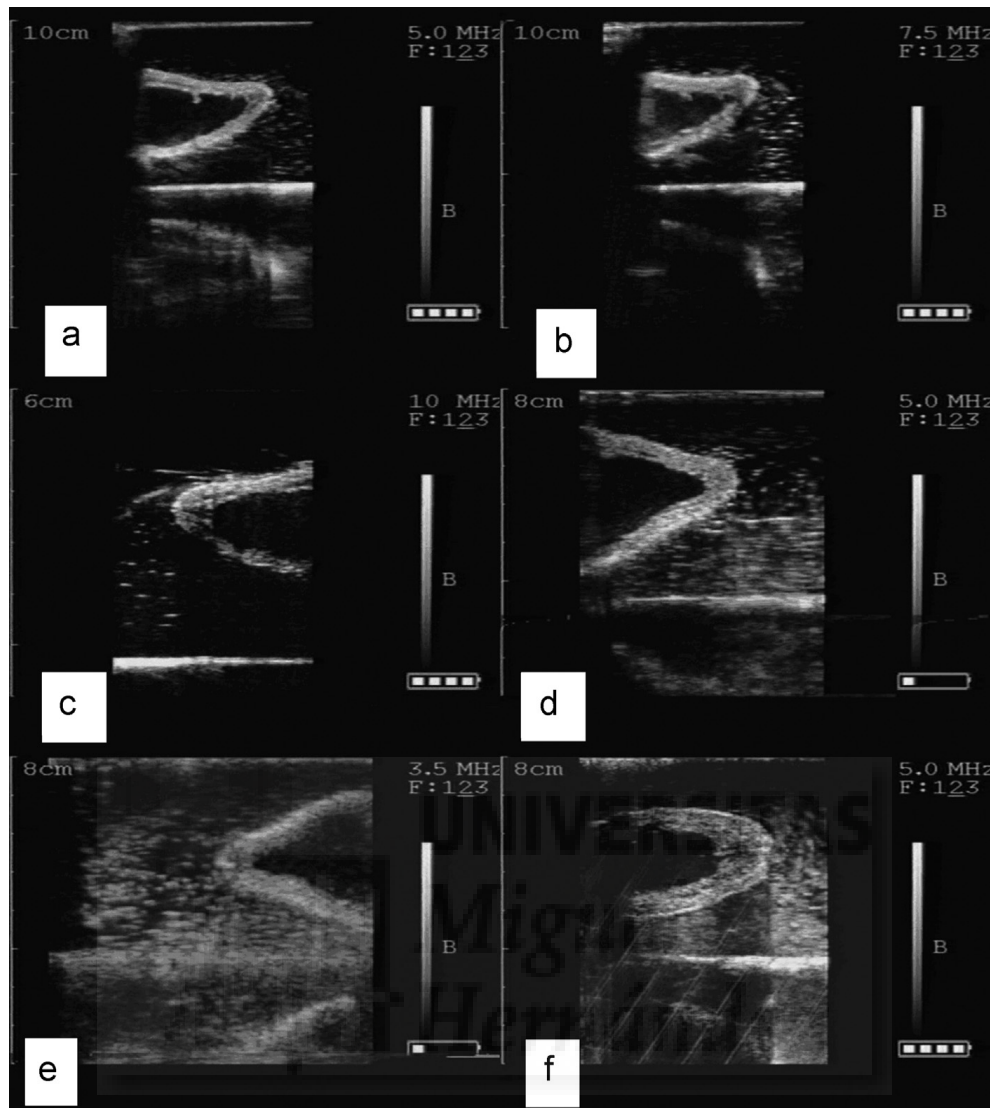
### 3. Results

The ultrasound scans showed no anatomical alteration of the internal structure in the teats examined. Moreover, immersing the teat in a plastic recipient allowed us to explore the teats of all the glands, even in those teats with a highly angular slope and insertion, without deforming the teat end and walls.

In the experiments carried out in goats (E1–E5 and E7), the teat canal could not be viewed clearly in all frames. Only in 7% of the images taken at frequencies of 5, 7.5 and 10 MHz before milking could the teat canal be distinguished, whereas after milking the percentage increased to 12% (10 MHz) and 16% (5 and 7.5 MHz). At 3.5 MHz frequency, the teat canal could only be distinguished in one image before and after milking. Moreover, in all the experiments performed after machine milking, there was an increase in TWT, TWA and TEWA compared to the values obtained before milking.

In the ultrasound scans performed at frequencies of 5 and 7.5 MHz, three layers could be clearly distinguished in the teat wall; the outer layer as a thin white line, the middle layer as a broad whitish-grey area with small anechogenic zones, and the inner layer as a thin white line (Fig. 2a, b, and d). When using the 10 MHz frequency, the inner teat wall was not clearly distinguished (Fig. 2c); using the 3.5 MHz frequency, the outer teat wall layer showed up as a very thick white line, whereas the inner edge of the walls was not clearly delimited with respect to the teat cistern (Fig. 2e). Similarly, due to the lesser exploration depth at 10 MHz, it was necessary to place the teat beside the wall of the recipient adjacent to the probe location, which limited the use of sonography in some of the larger glands. In other cases, the teat became deformed and, in general, the time spent performing ultrasound was affected. These drawbacks were eliminated at frequencies of 5, 7.5 and 3.5 MHz, as it





**Fig. 2.** Ultrasound images of goat teat taken in first experiment (E1) [(a) 5 MHz; (b) 7.5 MHz (c) 10 MHz], from experiment 2 (E2) [(d) 5 MHz; (e) 3.5 MHz] and from bovine teat taken in experiment 6 (E6) (f). E1: compared frequencies 5, 7.5 and 10 MHz in goats, E2: compared frequencies 5 and 3.5 MHz in goats. E6: compared frequencies 5 and 7.5 MHz in cows.

was recommendable to distance the teat from the probe, placing it in the middle of the recipient.

### 3.1. Exploration frequencies study

Table 1 shows the mean values of TWT, TWA and TEWA before and after milking and the difference (after–before), according to the exploration frequency in experiments E1 and E2. TWT, TWA and TEWA before and after milking were significantly lower at the 10 MHz frequency than at frequencies of 5 and 7.5 MHz. In contrast, TWT, TWA and TEWA values before and after milking obtained at 3.5 MHz frequency were greater ( $p < 0.001$ ) than those found at 5 MHz frequency. The results showed that the values obtained at frequencies of 5 and 7.5 MHz were similar, although when higher (10 MHz) or lower (3.5 MHz) frequencies were used, the values decreased and increased, respectively. The difference values calculated for these variables did not vary significantly ( $p > 0.05$ ) for the 5, 7.5 and 10 MHz frequencies,

but it was observed that the differences at 3.5 MHz frequency were smaller than at a frequency of 5 MHz.

### 3.2. Study of operator effect in application of the technique

Table 2 shows the operator effect (OP1 vs OP2) in carrying out the ultrasound examinations (E3), in measuring and choosing the ultrasound image (E4) and measurement of the variables on the ultrasound images (E5). An effect of the operator carrying out the explorations (E3) was observed on TEWA before milking (higher value for OP2). Although no significant differences were found in TEWA values after milking, or in the TWT and TWA differences, a lesser difference was found in TEWA with OP2. The operator effect on the choice of image (E4) before milking was similar to that found in E3, with higher values for OP2 ( $p < 0.01$ ) before milking, although in this case after milking significant differences were found in TWT and TEWA as well as in the TWT difference.

**Table 1**

Mean values for teat wall thickness (TWT), teat wall area (TWA) and teat end wall area (TEWA) before and after milking and the differences between both values, according to the exploration frequencies studied in both experiments (E1 and E2) in the first study.

Variables	E1 <sup>1</sup>					E2			
	n <sup>2</sup>	5 MHz	7.5 MHz	10 MHz	NS <sup>3</sup>	n	5 MHz	3.5 MHz	NS
<b>Before milking</b>									
Teat wall thickness, TWT (cm)	150	0.40 ± 0.02 <sup>a</sup>	0.44 ± 0.02 <sup>a</sup>	0.34 ± 0.02 <sup>b</sup>	**	220	0.47 ± 0.01	0.57 ± 0.01	***
Teat wall area, TWA (cm <sup>2</sup> )	150	0.68 ± 0.02 <sup>a</sup>	0.70 ± 0.02 <sup>a</sup>	0.60 ± 0.02 <sup>b</sup>	**	220	0.85 ± 0.01	0.94 ± 0.01	***
Teat end wall area, TEWA (cm <sup>2</sup> )	150	0.43 ± 0.03 <sup>a</sup>	0.45 ± 0.03 <sup>a</sup>	0.27 ± 0.03 <sup>b</sup>	***	220	0.69 ± 0.01	0.83 ± 0.01	***
<b>After milking</b>									
Teat wall thickness, TWT (cm)	150	0.55 ± 0.02 <sup>a</sup>	0.58 ± 0.02 <sup>a</sup>	0.46 ± 0.02 <sup>b</sup>	***	220	0.61 ± 0.01	0.67 ± 0.01	***
Teat wall area, TWA (cm <sup>2</sup> )	150	0.81 ± 0.02 <sup>a</sup>	0.85 ± 0.02 <sup>a</sup>	0.74 ± 0.02 <sup>b</sup>	**	220	0.95 ± 0.01	1.02 ± 0.01	***
Teat end wall area, TEWA (cm <sup>2</sup> )	150	0.69 ± 0.03 <sup>a</sup>	0.76 ± 0.03 <sup>a</sup>	0.49 ± 0.03 <sup>b</sup>	***	220	0.85 ± 0.01	0.93 ± 0.01	***
<b>Differences</b>									
Teat wall thickness, TWT (cm)	150	0.15 ± 0.02	0.14 ± 0.02	0.12 ± 0.02	ns	220	0.14 ± 0.01	0.10 ± 0.01	***
Teat wall area, TWA (cm <sup>2</sup> )	150	0.13 ± 0.02	0.15 ± 0.02	0.14 ± 0.02	ns	220	0.10 ± 0.01	0.07 ± 0.01	*
Teat end wall area, TEWA (cm <sup>2</sup> )	150	0.25 ± 0.04	0.30 ± 0.04	0.22 ± 0.04	ns	220	0.16 ± 0.02	0.11 ± 0.02	*

<sup>a-b</sup>Means within a row with different superscripts differ at \* ( $P < 0.05$ ); \*\* $p < 0.01$ ; \*\*\* $p < 0.001$ .

<sup>1</sup> E1: compared frequencies 5, 7.5 and 10 MHz; E2: compared frequencies 5 and 3.5 Mhz.

<sup>2</sup> n: Number of cases.

<sup>3</sup> NS: Significance level.

**Table 2**

Mean values for teat wall thickness (TWT), teat wall area (TWA) and teat end wall area (TEWA) before and after milking and the differences between both values, according to experience level of the operator (OP) in performing the scans (E3) and selecting (E4) and measuring (E5) the ultrasound images.

Variables	Operator effect											
	In scanning (E3) <sup>a</sup>				In image selection (E4)				In image measurement (E5)			
	n <sup>b</sup>	OP1 <sup>c</sup>	OP2	NS <sup>d</sup>	n	OP1	OP2	NS	n	OP1	OP2	NS
<b>Before milking</b>												
Teat wall thickness, TWT (cm)	92	0.42 ± 0.01	0.42 ± 0.01	ns	100	0.40 ± 0.01	0.42 ± 0.01	ns	100	0.40 ± 0.01	0.38 ± 0.01	ns
Teat wall area, TWA (cm <sup>2</sup> )	92	0.82 ± 0.02	0.85 ± 0.02	ns	100	0.68 ± 0.02	0.77 ± 0.02	***	100	0.68 ± 0.02	0.68 ± 0.02	ns
Teat end wall area, TEWA (cm <sup>2</sup> )	992	0.63 ± 0.02	0.71 ± 0.02	**	100	0.43 ± 0.03	0.53 ± 0.03	**	100	0.43 ± 0.03	0.35 ± 0.03	*
<b>After milking</b>												
Teat wall thickness, TWT (cm)	92	0.56 ± 0.01	0.56 ± 0.01	ns	100	0.55 ± 0.01	0.51 ± 0.01	*	100	0.55 ± 0.01	0.48 ± 0.01	***
Teat wall area, TWA (cm <sup>2</sup> )	92	0.96 ± 0.01	0.97 ± 0.01	ns	100	0.81 ± 0.01	0.85 ± 0.01	*	100	0.81 ± 0.01	0.75 ± 0.01	*
Teat end wall area, TEWA (cm <sup>2</sup> )	92	0.87 ± 0.02	0.86 ± 0.02	ns	100	0.68 ± 0.02	0.70 ± 0.02	ns	100	0.68 ± 0.02	0.52 ± 0.02	***
<b>Differences</b>												
Teat wall thickness, TWT (cm)	92	0.15 ± 0.01	0.14 ± 0.01	ns	100	0.15 ± 0.02	0.08 ± 0.02	**	100	0.15 ± 0.02	0.10 ± 0.02	ns
Teat wall area, TWA (cm <sup>2</sup> )	92	0.14 ± 0.01	0.11 ± 0.01	ns	100	0.13 ± 0.02	0.08 ± 0.02	ns	100	0.13 ± 0.03	0.08 ± 0.03	ns
Teat end wall area, TEWA (cm <sup>2</sup> )	992	0.24 ± 0.03	0.15 ± 0.03	*	100	0.25 ± 0.04	0.17 ± 0.04	ns	100	0.25 ± 0.04	0.17 ± 0.04	ns

<sup>a</sup> E3: 2 operators took ultrasound scans of the same glands; E4: 2 operators chose the best image from the same sonographic videos; E5: 2 operators performed measuring on the same images.

<sup>b</sup> n: Number of cases.

<sup>c</sup> OP1: Experienced operator; OP2: inexperienced operator.

<sup>d</sup> NS: Significance level \* ( $P < 0.05$ ); \*\* $p < 0.01$ ; \*\*\* $p < 0.001$ .

In the case of operator effect in measuring the ultrasound image, it was observed that the operator with least experience (OP2) underestimated the TEWA values before milking and those of TWT, TWA and TEWA after milking. Nevertheless, the differences (after–before) between the measurements taken by both operators were similar.

### 3.3. Method validation trials: comparison with cutimeter and ultrasound examination in cows

In the ultrasound scans of the teat in cows, the teat canal was clearly visible in all the frames as a thin white

line between two thin greyish-black lines (Fig. 2f). In Table 3, the mean values for TWT, TWA, TEWA and TCL are showing according to the 2 exploration frequencies used in the experiment (E6). It can be appreciated that before milking there are no significant differences between the frequencies of 5 and 7.5 MHz, nor in the difference (after–before milking). However, after milking the TWT, TEWA and TCL are significantly higher ( $p < 0.05$ ) at the 7.5 MHz frequency.

Table 4 shows the mean values of TWT, TWA and TEWA taken before and after milking and of the differences between the readings taken after and before milking,

according to the estimation method used (ultrasound or cutimeter) (E7). Considering the teat wall thickness as the sum of the thickness of the two walls of the teat, it can be appreciated that TWT measured in ultrasound images is greater than the TT gauged by cutimeter. In both cases, an increase in the teat wall thickness due to machine milking was observed.

The teat wall thickness measured by cutimeter (TT) presents a high correlation with TWT, TWA and TEWA, both before and after milking (Table 4).

**Table 3**

Mean values for teat wall thickness (TWT), teat wall area (TWA), teat end wall area (TEWA) and teat canal length (TCL), before and after milking, at the exploration frequency used in Holstein cows.

Variables	Exploration frequency			
	<i>n</i> <sup>a</sup>	5 MHz	7.5 MHz	NS <sup>b</sup>
<b>Before milking</b>				
Teat wall thickness (cm)	76	0.71 ± 0.01	0.73 ± 0.01	ns
Teat wall area (cm <sup>2</sup> )	76	3.30 ± 0.04	3.33 ± 0.04	ns
Teat end wall area (cm <sup>2</sup> )	76	2.65 ± 0.05	2.75 ± 0.05	ns
Teat canal length (cm)	76	1.4 ± 0.02	1.45 ± 0.02	ns
<b>After milking</b>				
Teat wall thickness (cm)	76	0.88 ± 0.02	0.93 ± 0.02	*
Teat wall area (cm <sup>2</sup> )	76	3.67 ± 0.04	3.74 ± 0.04	ns
Teat end wall area (cm <sup>2</sup> )	76	3.08 ± 0.06	3.27 ± 0.06	*
Teat canal length (cm)	76	1.55 ± 0.02	1.63 ± 0.02	*
<b>Differences</b>				
Teat wall thickness (cm)	76	0.18 ± 0.02	0.19 ± 0.02	ns
Teat wall area (cm <sup>2</sup> )	76	0.37 ± 0.04	0.40 ± 0.04	ns
Teat end wall area (cm <sup>2</sup> )	76	0.43 ± 0.06	0.52 ± 0.06	ns
Teat canal length (cm)	76	0.15 ± 0.03	0.18 ± 0.03	ns

<sup>a</sup> *n*: Number of cases.

<sup>b</sup> NS: significance level, \* (*P* < 0.05).

#### 4. Discussion

In the ultrasound scans performed at frequencies of 5 and 7.5 MHz, the different teat wall layers could be clearly distinguished as described by Franz et al. (2003, 2004) in cows, whereas at frequencies of 10 and 3.5 MHz not all the layers could be differentiated. This gave rise to the presence of significant differences in the readings for teat wall thickness and areas compared with those obtained at frequencies of 5 and 7.5 MHz. At 10 MHz, the values of the different variables (TWT, TWA and TEWA) were lower than with frequencies of 5 and 7.5 MHz, which may be because the inner teat wall was not clearly distinguished in all the images, since the depth to which ultrasound penetrates the soft tissue is directly related to the probing frequency employed (Nyland et al., 2002). As the frequency increased, the ultrasound penetration diminished and to observe the ultrasound image clearly it was necessary for the teat to be placed alongside the wall of the recipient and not in the centre as with the other frequencies. On the other hand, with the 3.5 MHz frequency the outer teat wall layer was visualised as a rather thick white line, which may be the reason that when measurements were taken in Autocad greater values were recorded than with the 5 MHz probe.

Franz et al. (2009) reported that to obtain good quality images of teats in cows it is necessary to use linear probes with frequencies of at least 7.5 MHz, and Franz et al. (2001) stated that in small ruminants the most recommended frequency was 8.5 MHz. However, using a frequency of 5 MHz in goats, Bruckmaier and Blum (1992) viewed the inner structures of the mammary gland and Fasul'kov et al. (2010) were able to visualise the features of the teat and mammary gland. In cows, at the same frequency, the teat wall layers and cistern could be clearly observed (Cartee et al., 1986) and it was also

**Table 4**

Mean values for teat wall thickness (TWT), teat wall area (TWA) and teat end wall area (TEWA) measured before and after milking and the difference between these values in ultrasound images; teat thickness (TT) measured by cutimeter; correlation coefficient of TT with TWT, TWA and TEWA.

Variable	Sonography		Cutimeter		Correlation coefficient <i>r</i>
	<i>n</i> <sup>a</sup>	Mean ± sd	<i>n</i>	Mean ± sd	
<b>Before milking</b>					
Teat wall thickness (cm)	1121	0.35 ± 0.08 <sup>b</sup> 0.69 ± 0.17 <sup>c</sup>	121	0.43 ± 0.07 <sup>c</sup>	0.69***
Teat wall area (cm <sup>2</sup> )	121	0.72 ± 0.11			0.67***
Teat end wall area (cm <sup>2</sup> )	121	0.47 ± 0.19			0.58***
<b>After milking</b>					
Teat wall thickness (cm)	121	0.43 ± 0.10 0.86 ± 0.19	121	0.45 ± 0.07	0.62***
Teat wall area (cm <sup>2</sup> )	121	0.84 ± 0.12			0.62***
Teat end wall area (cm <sup>2</sup> )	121	0.70 ± 0.19			0.61***
<b>Differences</b>					
Teat wall thickness (cm)	121	0.08 ± 0.08 0.17 ± 0.17	121	0.03 ± 0.04	0.17 ( <i>p</i> = 0.06)
Teat wall area (cm <sup>2</sup> )	121	0.13 ± 0.11			0.24**
Teat end wall area (cm <sup>2</sup> )	121	0.22 ± 0.19			0.22*

<sup>a</sup> *n*: Number of cases, \**p* < 0.05; \*\**p* < 0.01; \*\*\**p* < 0.001.

<sup>b</sup> Mean thickness value of the two teat walls.

<sup>c</sup> Summed thickness value of the two teat walls.

possible to measure the teat canal length and thickness (Ambord and Bruckmaier, 2010; Weiss et al., 2004).

In turn, some authors (Fahr et al., 2001; Ślósarz et al., 2010) using a 10 MHz frequency were able to observe clear images of the teat wall and teat end in dairy goats, although they did not report the degree of difficulty in achieving this, nor whether the same results might have been obtained using other frequencies.

In the present work, it was harder to obtain a clear image of the teat walls and teat end at 10 MHz frequency, and in the cases where it was achieved, the exploration time became too long, which in practice would limit the use of ultrasound scanning on commercial farms to gauge the effect of mechanical milking on the teat walls. This aspect, combined with decreased visibility of the lower teat wall, led the researchers to rule out the use of 10 MHz frequency in Murciano-Granadina goats. In contrast, at 3.5 MHz frequency it was easier to achieve an image of the teat end and walls, although the frame was not very clear and the inner edge of the walls bordering the teat cistern was quite diffuse and in several images part of the cistern was merged with the walls. These results could indicate that this frequency is also unsuitable to study the changes in teat wall thickness due to machine milking in Murciano-Granadina goats.

From the results obtained in this experiment it was considered that frequencies of 5 and 7.5 MHz were the most appropriate to estimate the teat wall changes brought about by mechanical milking in Murciano-Granadina goats. Moreover, taking into account that under field conditions gestation detection is performed in goats transabdominally, with the 5 MHz frequency being one of the most widely-used in detecting pregnancy in small ruminants, the use of this frequency in teat exploration means that the ultrasound technique can be applied more easily at field level on commercial farms, cutting the outlay costs on equipment.

The TWT values found in the different experiments are similar to those reported by Fahr et al. (2001) (0.42 and 0.56 cm before and after milking) measured at 1 cm from the Furstenberg rosette, albeit slightly lower than those published by Ślósarz et al. (2010) in Polish White improved breed goats (0.47 and 0.5 mm before milking in the left and right gland, respectively and 0.67–0.68 cm after milking in the left and right gland, respectively). These differences may be due to the breed and the measuring technique employed, although the increase in TWT found at frequencies of 5 and 7.5 MHz is between 30% and 40%, as also found by these authors.

The teat canal could not be appreciated in most of the frames, possibly due to the smaller size of teat canal compared to dairy cow, as with the same technique and equipment, using frequencies of 5 and 7.5 MHz, the teat canal was clearly visible in ultrasound scans of Holstein cows as a thin white line between two greyish-black lines, as described by Franz et al. (2001). Moreover, works in bovine have observed TWT and TCL values similar to those reported by different authors (Ambord and Bruckmaier, 2010; Glesson et al., 2002; Klein et al., 2005; Naumann and Fahr, 2000; Neijenhuis et al., 2001; Weiss et al., 2004).

Franz et al. (2003), in a trial with different breeds of dairy sheep, using a frequency of 8.5 MHz, were only able to visualise the teat canal in 52% of the ultrasound

explorations, indicating that it was not always possible to obtain adequate images in goats and sheep. However, other authors present teat canal length and diameter values in sheep (Wójtowski et al., 2006) and goats (Fahr et al., 2001; Ślósarz et al., 2010) with a 10 MHz frequency. These authors performed their measurements in the Furstenberg's rosette and moreover did not specify if it was possible to distinguish the canal in all the images and whether these values were estimated or actually measured.

Operator experience affected the variables studied. This effect is appreciated before milking in TWA (E4) and to a greater extent in TEWA (E3–E5), which may be because the teat canal end or the Furstenberg's rosette were taken as reference to determine the TEWA, and in those images where the teat canal is not observed clearly there may be a greater variation, especially in the trials on choosing and measuring of the images by different operators (in E3 and E4 the readings were taken by the operator with most experience).

After milking, the operator effect is appreciated in E4 and E5, with differences in TWT, TWA and TEWA, although we should note that these differences are very slight, from 0.04 to 0.07 cm for TWT and from 0.04 to 0.06 cm<sup>2</sup> for TWA. The less experienced operator (OP2) underestimated the values in E5 and although we cannot explain this pattern, it coincides with the findings of Ślósarz et al. (2010), where the least experienced operator underestimated the teat wall thickness values and teat canal length and diameter.

When analysing the differences (after–before milking) in all trials (E3–E5), differences were only observed ( $p < 0.05$ ) for TEWA in E3 and for TWT in E4, despite having found differences in the pre- and post-milking values. In cows, Klein et al. (2005) states that the operator's practical experience is related with the repeatability of the ultrasound exploration, so it is possible that the differences found are more likely to be due to the different levels of experience of the operators than the method's repeatability, although it would be necessary to develop IT programs to automate selection of the images and carry out the measurements automatically to reduce the effect of human factor.

Ultrasonography showed a high correlation with the cutimeter method. This correlation is seen with TWT, TWA and TEWA, in agreement with that found by Ambord and Bruckmaier (2010) who reported a high correlation between TWT and TT before ( $r=0.71$ ) and after ( $r=0.85$ ) machine milking in dairy cows. According to Hamann and Mein (1990), the increase in teat thickness after machine milking estimated by cutimeter is due almost exclusively to oedematization of the teat that takes place during milking, as the pressure exerted by the jaws of the device forces the re-expulsion of the blood accumulated in the teat, thus reducing the congestion that may have been caused. In the case of ultrasound, since there is no pressure on the teat, the measurement would include the congestion caused. This result shows that sonography can be applied as a useful method to estimate the teat thickness variation in Murciano-Granadina goats, and can also be used to detect anomalies and/or analyse teat structures and tissues.



## 5. Conclusions

The use of the ultrasound technique tried and tested in this work proved to be a suitable method to estimate the variation in teat wall thickness caused by machine milking in Murciano-Granadina goats. Given the ease of performing the ultrasound exploration of the teat on the farm, the sharpness of the images taken, the ease of taking the readings and the similarity of the values obtained in this work to those published by other authors, the frequencies of 5 and 7.5 MHz may be considered the most suitable to estimate the effect of mechanical milking on teat wall thickness in this caprine breed. Similarly, applying the 5 MHz frequency would allow technicians to use the same equipment and probes designed to detect pregnancy in goats, as no economic investment is needed to acquire another probe for teat exploration. Finally, the need for further studies is evident, to develop tools that help minimise the subjective effect of the operator on measurement of the variables in ultrasound images.

## Conflict of interest statement

The authors wish to confirm that there are no known conflicts of interests associated with this publication and there has been no significant financial support for this work that could have influenced its outcome.

## Acknowledgements

The authors are grateful to Patrice Emery (ECM, France) for his collaboration and lending the ultrasound material used in this work.

The study was supported by Project AGL2006-06909 (Ministerio de Educación y Ciencia and FEDER).

## References

- Ambord, S., Bruckmaier, R.M., 2010. Milk flow-dependent vacuum loss in high-line milking systems: effects on milking characteristics and teat tissue condition. *J. Dairy Sci.* 93, 3588–3594.
- Bruckmaier, R.M., Blum, J.M., 1992. B-mode ultrasonography of mammary glands of cows, goats and sheep during  $\alpha$ - and  $\beta$ -adrenergic agonist and oxytocin administration. *J. Dairy Res.* 59, 151–159.
- Cartee, R., Ibrahim, A., Mc Leary, D., 1986. B-mode ultrasonography of the bovine udder and teat. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 188 (11), 1284–1287.
- Fahr, R., Schulz, J., Rosner, F., 2001. Milking associated changes of the teat end in goats. [Melkbedingte Veränderungen an der Zitzenspitze der Ziege]. *Tierarztl. Prax.* 29 (G), 151–156.
- Fasulkov, I.R., Georgiev, P.I., Antonov, A.L., Atanasov, A.S., 2010. B-mode ultrasonography of mammary glands in goats during the lactation period. *Bulg. J. Vet. Med.* 13, 245–251.
- Franz, S., Hofmann-Parisot, M., Baumgartner, W., Windischbauer, G., Suchy, A., Bauder, B., 2001. Ultrasonography of the teat canal in cows and sheep. *Vet. Rec.* 149, 109–112.
- Franz, S., Hofmann-Parisot, M., Gutler, S., Baumgartner, W., 2003. Clinical and ultrasonographic findings in the mammary gland of sheep. *N. Z. Vet. J.* 51, 238–243.
- Franz, S., Hofmann-Parisot, M., Baumgartner, W., 2004. Evaluation of three-dimensional ultrasonography of the bovine mammary gland. *Am. J. Vet. Res.* 65, 1159–1163.
- Franz, S., Floek, M., Hofmann-Parisot, M., 2009. Ultrasonography of the bovine udder and teat. *Vet. Clin. Food Anim.* 25, 669–685.
- Glesson, D.E., O'callaghan, E.J., Rath, M.V., 2002. Effect of milking on bovine teat tissue as measured by ultrasonography. *Ir. Vet. J.* 55, 628–632.
- Hamann, J., Osteras, O., 1994. II Special aspects In: Teat Tissue reactions to machine milking and new infection risk. *Bull. Int. Dairy Fed.* 297, 35–41.
- Hamann, J., Mein, G.A., 1988. Responses of bovine teat to machine milking. Measurement of changes in thickness of the teat apex. *J. Dairy Res.* 55, 331–338.
- Hamann, J., Mein, G.A., 1990. Measurement of machine-induced changes in thickness of the bovine teat. *J. Dairy Res.* 57, 495–505.
- Hamann, J., Mein, G.A., Nipp, B., 1996. Recommended method for measuring changes in thickness of the bovine teat with spring-loaded calipers. *J. Dairy Res.* 63, 309–313.
- Hospes, R., Seeh, C., 2000. Ecografía y endoscopia de la ubre de la vaca. In: Temis Pharma, S.L. (Ed.), *Principios fundamentales*, vol. 1., Boehringer Ingelheim, Barcelona. (47 pp.).
- Isaksson, A., Lind, O., 1992. Teat reactions in cows associated with machine milking. *J. Vet. Med.* 39, 282–288.
- Klein, D., Flock, M., Khol, J., Franz, S., Stuger, H., Baumgartner, W., 2005. Ultrasonographic measurement of the bovine teat: breed differences, and the significance of the measurements for udder health. *J. Dairy Res.* 72, 296–302.
- Manzur, A., Díaz, J.R., Mehdid, A., Fernández, N., Peris, C., 2012. Effect of mid-line or low-line milking systems on milking characteristics in goats. *J. Dairy Res.* 79, 375–382.
- Mein, G.A., Neijenhuis, F., Morgan, W.F., Reinemann, D.J., Hilleron, J.E., Baines, J.R., Ohnstad, I., Rasmussen, M.D., Timms, L., Britt, J.S., Farnsworth, R., Cook, N., Hemling, T., 2001. Evaluation of bovine teat condition in commercial dairy herds: 1. Non-infectious factors. In: American Association of Bovine Practitioners National Mastitis Council. International Symposium on Mastitis and Milk Quality Proceedings, Vancouver, British Columbia, Canada, pp. 347–351.
- Mein, G.A., Williams, D.M.D., Reinemann, D.J., 2003. Effects of milking on teat-end hyperkeratosis: 1. Mechanical forces applied by the teatcup liner and responses of the teat. In: National Mastitis Council Regional Meetings Proceedings. National Mastitis Council, Fort Worth, TX, Madison, WI, pp. 114–123.
- Naumann, I., Fahr, R., 2000. Investigations of milk flow from udder quarters [Untersuchungen zum Milchfluss aus Eutervierteln]. *Arch. Tierz.* 43 (5), 431–440.
- Neijenhuis, F., Klungel, G.H., Hogeveen, H., 2001. Recovery of cow teats after milking as determined by ultrasonography scanning. *J. Dairy Sci.* 84 (12), 2599–2606.
- Nyland, T., Mattoon, J., Herrgesell, E., Wisner, E., 2002. Physical principles, instrumentation, and safety of diagnostic ultrasound. In: Nyland, T., Matton, J. (Eds.), *Small Animal Diagnostic Ultrasound*, second edition. Saunders, 461 pp.
- Paulrud, C., Clausen, S., Andersen, P.E., Rasmussen, M.D., 2005. Infrared thermography and ultrasonography to indirectly monitor the influence of liner type and overmilking on teat tissue recovery. *Acta Vet. Scand.* 46, 137–147.
- Skapetas, B., Katanos, J., Laga, V., Sinapis, E., Hatziminaoglou, I., 2008. Vacuum level for opening the teat sphincter and the change in the teat end wall thickness in response to the machine milking of indigenous Greek goats. *Czech J. Anim. Sci.* 53 (3), 112–118.
- Ślósarz, P., Wójtowski, J., Bielińska, S., Frackowiak, A., Ludwiczak, A., Krzyżewski, J., Bagnicka, E., Strzałkowska, N., 2010. Machine induced changes of caprine teats diagnosed by ultrasonography. *Afr. J. Biotechnol.* 9 (50), 8698–8703.
- Weiss, D., Weinfurter, M., Bruckmaier, R.M., 2004. Teat anatomy and its relationship with quarter and udder milk flow characteristics in dairy cows. *J. Dairy Sci.* 87, 3280–3289.
- Wójtowski, J., Ślósarz, P., Bielińska, S., Nowicki, S., Gut, A., Danków, R., 2006. Ultrasound image of morphological changes of teat end in sheep caused by machine milking. *Arch. Tierz. Dummerstorf* 49, 231–237. (Special issue).
- Zecconi, A., Bronzo, V., Piccinini, R., Moroni, P., Ruffo, G., 1996. Field study on the relationship between teat thickness changes and intramammary infections. *J. Dairy Res.* 63, 361–368.





**4.2. Study of ultrasound scanning as method to estimate changes in teat thickness due to machine milking in Manchega ewes.**

Alejandro, M., Rodríguez, M., Peris, C. y Díaz, J.R.,

Small Ruminant Research, 2014 - 119: 138-145

,  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.smallrumres.2014.02.007>





Contents lists available at ScienceDirect

## Small Ruminant Research

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/smallrumres](http://www.elsevier.com/locate/smallrumres)

# Study of ultrasound scanning as method to estimate changes in teat thickness due to machine milking in Manchega ewes

M. Alejandro<sup>a</sup>, M. Rodríguez<sup>b</sup>, C. Peris<sup>b</sup>, J.R. Díaz<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Departamento de Tecnología Agroalimentaria, Escuela Politécnica Superior de Orihuela, Universidad Miguel Hernández. Ctra. Beniel, Km. 3.2, 03312 Orihuela, Alicante, Spain

<sup>b</sup> Instituto de Ciencia y Tecnología Animal, Universidad Politécnica de Valencia, Camino de Vera s/n, 46022 Valencia, Spain

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 3 July 2013

Received in revised form 13 February 2014

Accepted 17 February 2014

Available online 28 February 2014

#### Keywords:

Teat

Ewe

Cutimeter

Ultrasound

Milking

Wall thickness

### ABSTRACT

To assess the ultrasound technique as a method for estimating the effect of machine milking on teat thickness in Manchega ewes, this work was carried out with a twofold objective: (1) to study the most suitable ultrasound exploration frequency and the effect of the operator in applying the technique and (2) to validate the approach, comparing it with measurements taken by another method (cutimeter). Three studies were designed for this purpose. In the first of them (E1), two experiments were carried out; the first tested frequencies at 5, 7.5 and 10 MHz and the second (E2) checked frequencies at 3.5 and 5 MHz. In the second study, 2 different operators (OP) independently performed ultrasound scans on the same animals (experiment 3, E3); they chose the best ultrasound exploration image recorded on video (experiment 4, E4) and took measurements in ultrasound images of ewes (experiment 5, E5). Finally, in the third study (experiment 6, E6) we designed an experiment in which ultrasound examinations and measurements by cutimeter were performed in the same animals.

The variables measured in the ultrasound scans were teat wall thickness (TWT), teat wall area (TWA) and teat end wall area (TEWA), while the cutimeter was used to gauge teat wall thickness (TT). At 10 MHz frequency it was not possible to obtain quality images of teats in ewes, so its subsequent use was ruled out. The teat canal was visible in 45%, 55% and 30% of the pre-milking images at frequencies of 5, 7.5 and 3.5 MHz, with values increasing after milking (63.4%, 77.5% and 36.3%). No significant differences were found in any of the variables (TWT, TWA and TEWA) between the measurements taken before and after milking at the 5 and 7.5 MHz frequencies. Similarly, TWT, TWA and TEWA were significantly greater ( $p < 0.001$ ) at the 3.5 MHz frequency than at 5 MHz. It was concluded that frequencies of 5 and 7.5 MHz were the most suitable for estimating the teat wall changes caused by mechanical milking.

Operator experience had no effect on the ultrasound explorations performed in the field, although it did significantly influence the choice and measurement of the images.

Mechanical milking caused an increase in TWT of 0.11 cm measured by ultrasound scanning and a reduction in TT of  $-0.06$  cm measured by cutimeter, which would indicate that ultrasound scanning is a more effective method to determine the degree of oedema and congestion caused by machine milking in ewes. In addition, we found a high correlation between TWT, TWA and TEWA with TT before and after milking.

\* Corresponding author. Tel.: +34 966749707; fax: +34 966749677.  
E-mail address: [jr.diaz@umh.es](mailto:jr.diaz@umh.es) (J.R. Díaz).

The use of ultrasound techniques may be a useful tool to evaluate the changes that occur in teat tissue due to machine milking in Manchega breed sheep, although it would be necessary to carry out further studies to enable the development of software to choose and measure the frames automatically to help reduce the operator effect on the choice and measurement of ultrasound variables.

© 2014 Elsevier B.V. All rights reserved.

## 1. Introduction

Machine milking can cause an alteration in the teat tissue fluid dynamics and a consequent negative effect on the teat's defence mechanisms (Paulrud et al., 2005) that may lead to higher intramammary infection rates (O'Shea, 1987). To estimate the changes taking place in the teat end and teat wall, different qualitative methods have been proposed, such as changes in teat colour (Hillerton et al., 2002) or the degree of oedema and congestion at the base and end of the teat (Mein et al., 2001), as well as quantitative approaches such as laser Doppler flowmetry (Persson, 1991), infrared thermography (Paulrud et al., 2005), cutimeter (Hamann et al., 1996) and ultrasound (Neijenhuis et al., 2001).

Different studies carried out using ultrasound techniques have shown that mechanical milking, even when performed in suitable conditions, causes an increase in thickness of the teat wall (TWT) in cows (Gleeson et al., 2002; Neijenhuis et al., 2001; Paulrud et al., 2005), goats (Fahr et al., 2001; Ślósarz et al., 2010) and sheep (Wójtowski et al., 2006). When teat thickness was measured by cutimeter, an increase was also reported in cows (Forsbäck et al., 2005; Hamann and Mein, 1990; Tamburini et al., 2010) and goats (Fahr et al., 2001; Manzur et al., 2012; Skapetas et al., 2008). However, in sheep the teat thickness measured by cutimeter after machine milking was reduced (Peris et al., 2003a), even when overmilking took place (Peris et al., 2003b). The differences in the change in thickness of teat tissues caused by machine milking may be due to the fact that with ultrasound scanning no pressure is exerted on the teat, whereas with the cutimeter the jaws exert a pressure that forces re-evacuation of the blood, reducing the congestion that may have been caused (Hamann and Mein, 1990).

In recent years, ultrasound has been used in sheep to study the internal teat structures (Franz et al., 2001), the relation between teat anatomy and intramammary infection (Franz et al., 2003) and the changes in teat tissue due to machine milking (Wójtowski et al., 2006).

In goats, exploration frequencies of 5 MHz (Díaz et al., 2013; Fasulkov et al., 2010), 7.5 MHz (Díaz et al., 2013) and 10 MHz (Díaz et al., 2013; Fahr et al., 2001; Ślósarz et al., 2010) have all been used to estimate the variation in thickness of the teat wall caused by machine milking, although Díaz et al., 2013 do not recommend the use of the latter. However, in sheep there are few studies on the use of ultrasound scanning to study teat tissues. Wójtowski et al., 2006 used a 10 MHz frequency to determine the effects of machine milking on teat wall thickness, whereas frequencies of 5 and 8.5 MHz (Bruckmaier and Blum, 1992; Franz et al., 2003, respectively) have been used to study the

internal teat structures. One of the factors to be considered when applying the technique is the operator's experience in capturing and measuring the ultrasound images, since in studies carried out in cows (Klein et al., 2005) and goats (Díaz et al., 2013; Ślósarz et al., 2010) it was observed that the experience of the operator can have a significant effect on the measurements taken.

As there is little information on the use of ultrasound technique to estimate changes in teat tissue in Manchega breed sheep, the present work was proposed with a dual objective: (1) to study the most suitable ultrasound exploration frequency and the effect of the operator in applying the technique; (2) to validate the approach, comparing it with measurements taken by another mediation method (cutimeter).

## 2. Materials and methods

### 2.1. Animals, housing and management

The experiments were carried out at the Educational and Research Farm of the Escuela Politécnica Superior de Orihuela (EPSO) belonging to Miguel Hernández University (UMH) and the Experimental Farm of the Animal Science Technology Institute (ICTA) at the Universidad Politécnica de Valencia (UPV).

The UMH farm herd consists of 80 Manchega breed ewes. During experiments, animals were kept in free stall housing, with daytime access to exercise yards. The milking parlour was "Casse" type with a quick exit stalls, one platform with 12 places and 12 low-line milking units (1 × 12 × 12). The facility had electronic milk recorders and teatcups with automatic vacuum shut-off valves and silicone liners (Top Flow S) (Gea Farm Technologies, Bönen, Germany). The milking parameters used were 36 kPa vacuum level (VL): 180 ppm pulsations rate (PR) and 50% pulsation ratio (PRT).

The ICTA Small Ruminants Experimental Farm of the UPV has capacity for 90 Manchega breed ewes. During the experiments, the animals were housed in permanent stabling conditions. The milking parlour was "Casse" type with a quick release trap and automatic feeder trough, 2 platforms with 12 places each and six midline milking units (2 × 12 × 6). The milking unit consisted of a collector (SG-TF80 ML) with manual shut-off key and the teatcup used had automatic shut-off valve and silicone liner (Almatic S10) (DeLaval International AB, Tumba, Sweden). The milking parameters used were: VL: 36 kPa, PR: 180 ppm, PRT 50%.

On both farms, 5 weeks after parturition the lambs were separated from the ewes, which were then machine milked twice daily. In addition, the machine milking routine for the animals consisted of teatcup placing, mechanical milking, machine stripping and teatcup removal. Finally, after milking teats were immersed in an iodine solution.

### 2.2. Experimental design and data processing

To achieve the stated aims, three studies were carried out:

- Exploration frequencies study.
- Study of operator effect in application of the technique.
- Method validation study: comparison with cutimeter.

### 2.2.1. Exploration frequencies study

Two experiments were performed in this trial. The first (E1) was carried out at the ICTA experimental farm of the UPV, using 52 ewes. The second experiment (E2) took place at the UMH Training Farm and 49 ewes were used. In both experiments, animals were in their second month of lactation. Ultrasound scans were performed before and after milking on two consecutive days.

The order of use of the pre- and post-milking exploration frequencies in E1 was as follows: the dual frequency probe was fitted first (5–7.5 MHz), initially performing the ultrasound scan at 5 MHz frequency, before changing to 7.5 MHz frequency; Next the 10 MHz abdominal probe was fitted and the ultrasound exploration was attempted at this frequency. Due to the difficulty encountered on the first day in scanning at this frequency, on the second day only images at frequencies of 5 and 7.5 MHz were taken.

In E2, we set out using the 5 MHz frequency before examining the teats at a frequency of 3.5 MHz.

### 2.2.2. Study of operator effect in application of the technique

Three experiments were designed for this trial: the first (E3) was carried out at the ICTA farm of the UPV and 21 ewes from different parity number were used. At morning milking, two different operators, one with broad experience in performing examinations (OP1) and the other inexperienced (OP2), carried out ultrasound scans on the right gland of the same animals before and after milking, using a 5 MHz frequency. Thus, before and after milking OP1 performed the scans first, which were then carried out immediately afterwards by OP2. OP1 was responsible for selecting the echographic images and measurements.

In the second experiment in this study (E4), we used videos of ultrasound scans of 25 animals taken before and after milking at a frequency of 5 MHz by OP1. At this point, 2 different operators, one fully experienced (OP1) and another with no experience (OP2), were asked to view the video and choose the most suitable image or frame following their own criteria. OP1 subsequently carried out the measurements on all the images.

In the third experiment (E5) of this study, we used ultrasound images extracted by OP1 in E4 from a video recording of 25 ewes taken before and after milking at a frequency of 5 MHz by OP1. These frames were measured in AutoCAD 2000 (Autodesk, Inc., USA) by 2 different operators, one with ample experience (OP1) and another inexperienced (OP2) in the measurements.

### 2.2.3. Method validation study: comparison with cutimeter

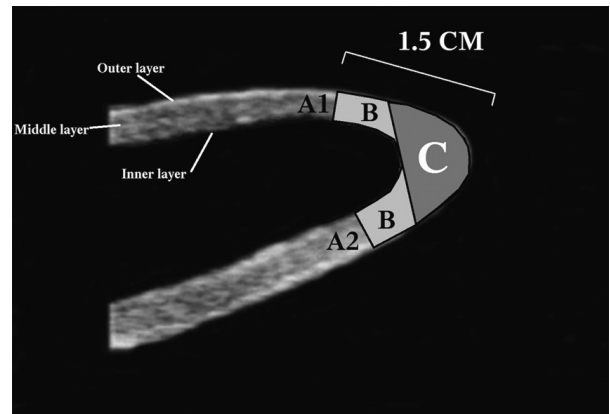
In this study, we designed an experiment (E6) to compare the exploration methods with ultrasound and measurement proposed by Díaz et al., 2013 with the cutimeter technique. The experiment was held at the ICTA farm of the UPV, at the same time and with the same animals used in E1. Over two consecutive days, pre- and post-milking ultrasound explorations were performed on the teat of the right gland of the animals before measuring the teat wall thickness (TT) with the cutimeter.

## 2.3. Ultrasound scans

To perform the scans, a portable ultrasound unit (Agroscan AL, ECM, Noveko International Inc., France) was used, fitted with 3 interchangeable linear probes: a 5 and 7.5 MHz dual frequency rectal probe (ALR 575); a 10 MHz frequency abdominal probe (ALA 100) and a 3.5 MHz abdominal probe (ALR 350). For the examination, a transparent plastic recipient 53 mm in diameter and 80 mm in height was used, filled with water at 37 °C. The water was changed every three animals or previously if there were many particles in suspension. Moreover, to improve the image quality, the probe was placed inside a latex bag (Control Forte, Artsana Spain, SAU, Spain) filled with contact gel (TRANSONIC-GEL, Telic, S.A., Spain) and contact gel was applied between the latex bag and the recipient. The probe was placed in a vertical plane parallel to the longitudinal axis of the teat and kept the same before and after milking.

The methodology used was described by Díaz et al., 2013 for recording, image capture and measurement of the different variables in the echographic images: teat wall thickness (TWT, mean value of the two walls observed, cm), teat wall area (TWA, cm<sup>2</sup>) and teat end area (TEWA, cm<sup>2</sup>). As the teat tip in sheep has a greater surface and a longer teat canal than in goats, TWT and TWA were measured at 1.5 cm from the teat end (Fig. 1).

Ultrasound scans were performed in the right gland of each animal just before the teatcup attachment and immediately after their removal.



**Fig. 1.** Measurements on ultrasound image: teat wall thickness,  $TWT = (A1 + A2)/2$ ; teat wall area,  $TWA = B + C$ ; teat-end wall area,  $TEWA = C$ . Outer layer (epidermis), middle layer (muscle-fibre vascular tissue), inner layer (epithelial mucose).

Selecting the ultrasound images (frames) for study and measurements was always performed by the same operator, except in the trial studying the effect of the operator in choosing the images.

## 2.4. Cutimeter

For the cutimeter trial, a spring-load calliper (N° 33865; Hauptner, D-42651 Solingen) was used, fitted with a spring exerting a force of 6.7 N (400 mm<sup>2</sup>, 0.01675 N/mm<sup>2</sup>). Teat thickness (TT) was defined as the distance (cm) between the cutimeter jaws after applying pressure to the teat end. To estimate TT with the cutimeter, we followed the methodology proposed by Hamann et al., 1996. In addition, measurements were also taken in duplicate; after the initial application, the cutimeter was opened and the thickness gauged again without changing the device's position (Isaksson and Lind, 1992). The mean of these two measurements was the TT value considered.

Teat scans and cutimeter measurements were performed before and after milking, to determine the teat thickness variation as the difference between the readings taken (difference, cm = post-milking reading - pre-milking reading).

## 2.5. Statistical analysis

The association between the explanatory variables and ultrasonography variables (TWT, TWA and TEWA) was assessed using a stepwise linear mixed model procedure (MIXED, SAS Institute Inc., V.9.1. 2002). The TWT, TWA and TEWA measured before and after milking and their differences were determined as outcome variables:

In the examination frequency studies (E1 and E2), the data were analysed separately for the values taken before and after milking and for the difference obtained from the previous values. The effects considered in each experiment were:

**E1.** Fixed effect of frequency (*F*, 2 levels: 5 and 7.5 MHz), fixed effect of date (*D*, 2 levels: day 1 and day 2), random effect of animal (*A*, 52 levels: 1, 2, 3, ..., 52).

**E2.** Fixed effect of frequency (*F*, 2 levels: 5 and 3.5 MHz), fixed effect of date (*D*, 2 levels: day 1 and day 2), random effect of animal (*A*, 49 levels: 1, 2, 3, ..., 49).

The association between the explanatory variables and ultrasonography variables at E3, E4, E5 and E6 was assessed using a general linear model procedure (ANOVA, SAS Institute Inc, V.9.1. 2002)

**E3.** Operator effect (OP, 2 levels: 1 and 2) and animal effect (*A*, 21 levels: 1, 2, 3, ..., 21).

**E4.** Operator effect (OP, 2 levels: 1 and 2) and animal effect (*A*, 25 levels: 1, 2, 3, ..., 25).

**E5.** Operator effect (OP, 2 levels: 1 and 2) and animal effect (*A*, 25 levels: 1, 2, 3, ..., 25).



The relationship between teat thickness as measured by ultrasonography and cutimeter (E6) was studied using the coefficient of correlation (PROC CORR, SAS Institute Inc., V.9.1., 2002).

### 3. Results

With the technique applied, we were able to obtain clear images of the teat wall and teat end in Manchega ewes. However, with the 10 MHz probe it was not possible to obtain quality images of teats in the ewes, as the teat end wall and lower part of the teat cistern wall could not be seen. For this reason, its use was ruled out on day two of the experiment.

The ultrasound scans showed no anatomical alteration of the internal structure in the teats examined. In experiments E1 and E2, we were able to visualise the teat canal at 46.5% with the 5 MHz frequency, 55.3% with 7.5 MHz frequency and 30.6% with 3.5 MHz frequency before milking. After milking, the percentage increased up to 63.4%, 77.5% and 36.3% at frequencies of 5, 7.5 and 3.5 MHz, respectively.

Moreover, in all the experiments performed after machine milking, there was an increase in TWT, TWA and TEWA compared to the values obtained in pre-milking.

In the ultrasound scans performed at frequencies of 5 and 7.5 MHz, three layers in the teat wall could be clearly distinguished; the outer layer as a thin white line (epidermis), the middle layer as a broad whitish-grey area with small anechogenic zones (muscle-fibre vascular tissue), and the inner layer as a thin white line (epitelial mucose) (Fig. 2a–c). At 10 MHz frequency, the outer teat wall layer showed up as a very thick white line and the inner edge of

the wall was not clearly delimited with respect to the teat cistern (Fig. 2d).

#### 3.1. Exploration frequencies study

Table 1 shows the mean values of TWT, TWA and TEWA before and after milking and the difference (after–before), according to the exploration frequency in experiments E1 and E2. TWT, TWA and TEWA before and after milking showed no significant differences between frequencies of 5 and 7.5 MHz.

The TWT, TWA and TEWA values obtained at 3.5 MHz frequency were significantly greater ( $P < 0.001$ ) than those obtained at 5 MHz frequency, both before and after milking.

No significant differences in thickness variation were found between frequencies of 5 and 7.5 MHz. In the case of the 3.5 MHz frequency, it was observed that the variation in TWT and TWA was significantly lower than at 5 MHz frequency, although the TEWA variation was similar between both frequencies.

#### 3.2. Study of operator effect in application of the technique

Table 2 shows the effect of the operator (OP1 vs OP2) in carrying out sonographic explorations (E3), measuring and selecting the echographic image (E4) and measuring the variables on the ultrasound frames (E5). It was observed that the operator's experience in performing teat examinations had no effect on the before and after values, or on the thickness variation. In image selection, the operator did have a significant effect ( $P < 0.05$ ) on the TWT, TWA and

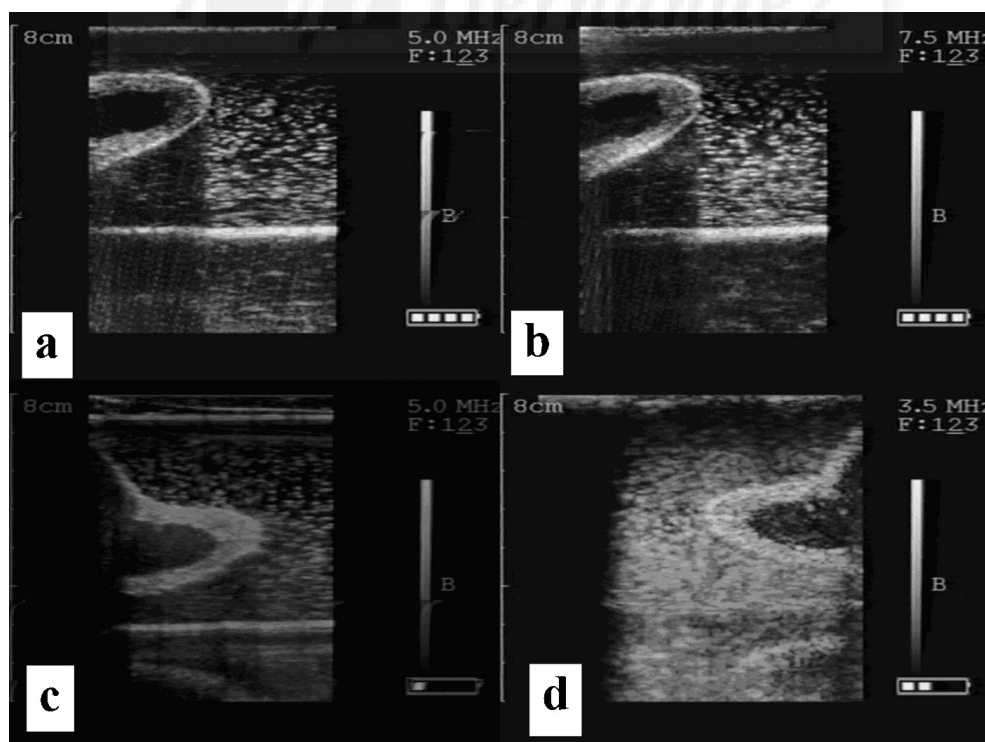


Fig. 2. Ultrasound images of ovine teat taken in first experiment (E1) [(a) 5 MHz; (b) 7.5 MHz]; from experiment 2 (E2) [(c) 5 MHz; (d) 3.5 MHz]. E1: compared frequencies 5 and 7.5 MHz, E2: compared frequencies 5 and 3.5 MHz.

**Table 1**

Mean values for teat wall thickness (TWT), teat wall area (TWA) and teat end wall area (TEWA) before and after milking and the differences between both values, according to the exploration frequencies studied in the two experiments (E1 and E2) in the first study.

Variables	E1 <sup>1</sup>			E2		
	5 MHz	7.5 MHz	NS <sup>2</sup>	5 MHz	3.5 MHz	NS
<b>Before milking</b>						
Teat wall thickness, TWT (cm)	0.38 ± 0.01	0.40 ± 0.01	ns	0.44 ± 0.01	0.57 ± 0.01	***
Teat wall area, TWA (cm <sup>2</sup> )	1.25 ± 0.02	1.28 ± 0.02	ns	1.47 ± 0.01	1.62 ± 0.01	***
Teat end wall area, TEWA (cm <sup>2</sup> )	0.75 ± 0.02	0.80 ± 0.02	ns	1.13 ± 0.02	1.31 ± 0.02	***
<b>After milking</b>						
Teat wall thickness, TWT (cm)	0.50 ± 0.01	0.50 ± 0.01	ns	0.59 ± 0.01	0.66 ± 0.01	***
Teat wall area, TWA (cm <sup>2</sup> )	1.46 ± 0.02	1.46 ± 0.01	ns	1.62 ± 0.01	1.71 ± 0.01	***
Teat end wall area, TEWA (cm <sup>2</sup> )	1.00 ± 0.03	1.00 ± 0.03	ns	1.36 ± 0.02	1.48 ± 0.02	***
<b>Differences</b>						
Teat wall thickness, TWT (cm)	0.11 ± 0.01	0.10 ± 0.01	ns	0.15 ± 0.01	0.09 ± 0.01	***
Teat wall area, TWA (cm <sup>2</sup> )	0.21 ± 0.02	0.17 ± 0.02	ns	0.15 ± 0.01	0.09 ± 0.01	**
Teat end wall area, TEWA (cm <sup>2</sup> )	0.25 ± 0.03	0.20 ± 0.03	ns	0.23 ± 0.03	0.17 ± 0.03	ns

Number of cases: E1, 208; E2, 196.

<sup>1</sup> E1, compared frequencies 5 and 7.5; E2, compared frequencies 5 and 3.5 MHz.

<sup>2</sup> NS: Significance level. \*\**P* < 0.01; \*\*\**P* < 0.001.

**Table 2**

Mean values of teat wall thickness (TWT), teat wall area (TWA) and teat end wall area (TEWA) before and after milking (differences between both values), according to degree of operator experience (OP) in performing the scans (E3) and selecting (E4) and measuring (E5) the ultrasound images.

Variables	Operator effect									
	In scanning (E3) <sup>1</sup>			In image selection (E4)			In image measurement (E5)			
	OP1 <sup>2</sup>	OP2	NS <sup>3</sup>	OP1	OP2	NS	OP1	OP2	NS	
<b>Before milking</b>										
Teat wall thickness, TWT (cm)	0.45 ± 0.01	0.44 ± 0.01	ns	0.37 ± 0.01	0.40 ± 0.01	**	0.37 ± 0.01	0.40 ± 0.01	**	**
Teat wall area, TWA (cm <sup>2</sup> )	1.48 ± 0.03	1.48 ± 0.03	ns	1.28 ± 0.02	1.36 ± 0.02	**	1.28 ± 0.03	1.12 ± 0.03	***	***
Teat end wall area, TEWA (cm <sup>2</sup> )	1.03 ± 0.05	1.09 ± 0.05	ns	0.78 ± 0.03	0.91 ± 0.03	**	0.78 ± 0.03	0.38 ± 0.03	***	***
<b>After milking</b>										
Teat wall thickness, TWT (cm)	0.55 ± 0.01	0.57 ± 0.01	ns	0.51 ± 0.01	0.53 ± 0.01	*	0.51 ± 0.01	0.49 ± 0.01	ns	ns
Teat wall area, TWA (cm <sup>2</sup> )	1.61 ± 0.02	1.67 ± 0.02	ns	1.47 ± 0.02	1.52 ± 0.02	*	1.47 ± 0.02	1.46 ± 0.02	ns	ns
Teat end wall area, TEWA (cm <sup>2</sup> )	1.21 ± 0.05	1.29 ± 0.05	ns	0.98 ± 0.03	1.17 ± 0.03	***	0.98 ± 0.04	0.75 ± 0.04	***	***
<b>Differences</b>										
Teat wall thickness, TWT (cm)	0.10 ± 0.02	0.13 ± 0.02	ns	0.13 ± 0.01	0.13 ± 0.01	ns	0.13 ± 0.01	0.09 ± 0.01	**	**
Teat wall area, TWA (cm <sup>2</sup> )	0.14 ± 0.04	0.20 ± 0.04	ns	0.19 ± 0.02	0.16 ± 0.02	ns	0.19 ± 0.03	0.35 ± 0.03	**	**
Teat end wall area, TEWA (cm <sup>2</sup> )	0.18 ± 0.07	0.20 ± 0.07	ns	0.20 ± 0.04	0.26 ± 0.04	ns	0.20 ± 0.05	0.37 ± 0.05	*	*

Number of cases: E3, 42; E4, 50; E5, 50.

<sup>1</sup> E3, 2 operators took ultrasound scans of the same glands; E4, 2 operators chose the best image from the same sonographic videos; E5, 2 operators performed measuring on the same images.

<sup>2</sup> OP1, experienced operator; OP2, inexperienced operator.

<sup>3</sup> NS, significance level. \**P* < 0.05; \*\**P* < 0.01; \*\*\**P* < 0.001.

TEWA values before and after milking (we can see that the values of the variables obtained in the images selected by OP2 are greater than for those chosen by OP1), although this effect is not appreciated in the thickness variation.

In E5, the least experienced operator (OP2) underestimated the TWA and TEWA values before milking and the TEWA value after milking. Moreover, the variations in TWA and TEWA presented by OP2 were greater (*P* < 0.05) than with OP1, whereas the TWT variation was lower than with OP1.

### 3.3. Method validation trials: comparison with cutimeter

Table 3 shows the mean teat wall thickness values measured by cutimeter (TT) and ultrasonography (TWT) before and after milking, as well as the TWA and TEWA values and the variation compared to the pre-milking values.

It shows that TT measured by cutimeter after milking is lower than the value reported before milking, which would mean that there was a reduction in wall thickness. However, in the case of the measurements obtained by sonography, an increase is observed in TWT, TWA and TEWA due to mechanical milking.

A positive and high correlation was found between the variables of thickness and area of the teat wall (TWT, TWA and TEWA) and the teat thickness (TT) measured by cutimeter, before and after milking and in the thickness variations. The highest correlation was found between the TT and TWT values before milking.

## 4. Discussion

The methodology developed by the research team and the equipment used for ultrasound teat examination in



**Table 3**

Mean values of teat wall thickness (TWT), teat wall area (TWA) and teat end wall area (TEWA) measured before and after milking and of the variation with milking and its correlation with teat wall thickness (TT) as measured by cutimeter.

Variable	Sonography mean $\pm$ SD	Cutimeter mean $\pm$ SD	Correlation coefficient <i>r</i>
Before milking			
Teat wall thickness, TWT (cm)	0.38 $\pm$ 0.11 <sup>1</sup> (0.76 $\pm$ 0.22) <sup>2</sup>	0.58 $\pm$ 0.09	0.65 <sup>***</sup>
Teat wall area, TWA (cm <sup>2</sup> )	1.25 $\pm$ 0.23		0.58 <sup>***</sup>
Teat end wall area, TEWA (cm <sup>2</sup> )	0.75 $\pm$ 0.32		0.35 <sup>***</sup>
After milking			
Teat wall thickness, TWT (cm)	0.50 $\pm$ 0.09 (1.00 $\pm$ 0.18)	0.52 $\pm$ 0.07	0.38 <sup>***</sup>
Teat wall area, TWA (cm <sup>2</sup> )	1.46 $\pm$ 0.19		0.44 <sup>***</sup>
Teat end wall area, TEWA (cm <sup>2</sup> )	1.00 $\pm$ 0.35		0.34 <sup>***</sup>
Differences			
Teat wall thickness, TWT (cm)	0.11 $\pm$ 0.11 (0.22 $\pm$ 0.22)	−0.06 $\pm$ 0.07	0.33 <sup>***</sup>
Teat wall area, TWA (cm <sup>2</sup> )	0.20 $\pm$ 0.23		0.29 <sup>**</sup>
Teat end wall area, TEWA (cm <sup>2</sup> )	0.25 $\pm$ 0.38		0.22 <sup>*</sup>

\*  $P < 0.05$ .

\*\*  $P < 0.01$ .

\*\*\*  $P < 0.001$ .

Number of cases: 104.

<sup>1</sup> Mean thickness value of the two teat walls.

<sup>2</sup> Summed thickness value of the two teat walls.

goats was useful in the teat examinations of Manchega breed dairy ewes. In the ultrasound scans performed at frequencies of 5 and 7.5 MHz, three different teat wall layers could be clearly distinguished, as described by Franz et al., 2003, 2004 in cows and Díaz et al., 2013 in goats. Unlike that reported by Wójtowski et al., 2006, with the 10 MHz frequency it was not possible to obtain images of the teats in sheep, as the teat end wall and the lower wall of the cistern were not clearly appreciated, and in those cases where a suitable image was obtained, the exploration time became so lengthy that the use of this frequency was no longer practical. Díaz et al., 2013, in goats, noted that with the 10 MHz frequency it was more difficult to observe the teat tissues and advised against its use in the field to determine the changes in teat tissues caused by machine milking in Murciano-Granadina goats.

In the case of the 3.5 MHz probe, the outer teat wall layer was shown as a very thick white line, which might explain the higher values for TWT, TWA and TEWA ( $P < 0.001$ ) compared to those at 5 MHz. These results agree with those reported by Díaz et al., 2013 in Murciano-Granadina goats, where greater teat thickness and area values were found with the 3.5 MHz frequency compared to 5 MHz.

At 3.5 MHz frequency, it was easier to achieve an image of the teat end and wall than at 10 MHz, although the frame was not very clear and the inner edge of the wall bordering the teat cistern was rather diffuse, while in several frames part of the cistern was merged with the wall. These aspects led the authors to rule out the use of 3.5 and 10 MHz frequencies to study the changes in teat wall thickness caused by machine milking in Manchega breed ewes.

Franz et al., 2009 recommended the use of an 8.5 MHz frequency to obtain good quality images of teats in small ruminants, while Díaz et al., 2013 recommend frequencies of 5 and 7.5 MHz in goats. On the other hand, Wójtowski et al., 2006 reported that clear images of the teat wall and teat end were obtained with a 10 MHz frequency in dairy ewes, although they did not note the degree of difficulty in achieving them. In cows, at 5 MHz frequency, the teat

wall layers and cistern could be clearly observed (Cartee et al., 1986) and it was also possible to measure the teat canal length and thickness (Ambord and Bruckmaier, 2010; Weiss et al., 2004).

From the results obtained in this experiment, it was considered that frequencies of 5 and 7.5 MHz were the most suitable to estimate the teat wall changes brought about by mechanical milking in Manchega breed sheep. Moreover, taking into account that under field conditions gestation detection is performed transabdominally in small ruminants, with 5 MHz frequency one of the most commonly used for pregnancy detection, the use of this frequency in teat examinations allows a saving on equipment costs.

The TWT values obtained in this work at frequencies of 5 and 7.5 MHz are lower than those reported by Wójtowski et al., 2006 in East Friesian ewes with a 10 MHz frequency (0.53 mm and 0.60 mm, before and after milking, respectively), which could be due to morphological differences between the breeds studied, the mechanical milking practiced, differences in the measuring methodology, or other uncontrolled variation factors.

On the other hand, the teat canal could be seen in approximately half of the pre-milking frames with the 5 and 7.5 MHz frequencies, increasing up to 70% after milking, possibly due to the increase in canal length caused by machine milking (Wójtowski et al., 2006). For this reason, visibility of the canal alone could not be taken into account in choosing the best image, as indicated by Franz et al., 2003, so it was also necessary to take the visibility of the inner and outer edge of the teat wall and teat end into account. These percentage teat canal results observed are higher than those reported by Díaz et al., 2013 in goats and similar to those found by Franz et al., 2003 in sheep, where the teat canal of dairy ewes was only visible in 52% of the ultrasound examinations.

Operator experience had no effect on the variables studied in carrying out the ultrasound explorations (E3). This may be because the examinations were recorded on video,

so many images of the same teat were available to be selected by the operators. Thus, even though the operator had no experience, there were many opportunities to achieve a good image of each teat.

On the other hand, in selection of the frame (E4) and measurement of the echographic images (E5), operator experience did affect the variables studied. Notwithstanding the above, the variation of the variables (after–before milking) was only affected in E5. Klein et al., 2005 reported that the practical experience of the operator is related with the repeatability of the ultrasound exploration. In goats, Díaz et al., 2013 indicate that operator experience affected the measuring and selection of the echographic images. Moreover, these authors found that the operator with least experience underestimated the values of TWT, TWA and TEWA, as also reported by Ślósarz et al. (2010) in dairy goats. In this work, it was found that OP2 underrated the values of TWA before milking and TEWA before and after milking. In this sense, the development of software to measure the frames automatically would be interesting, with the aim of reducing the operator effect on measurement of the images.

In experiments carried out with cutimeter, some authors have found negative differences in TT in dairy ewes. Sinapis et al., 2006 indicated that the post-milking TT was reduced if milking is done with vacuum levels of 38 kPa, although when vacuum level was increased to 44 and 50 kPa, the TWT values after milking increased (0.06 and 0.22 mm, respectively). This increase in TT values may indicate that oedema has occurred in the teat end tissues (Hamann and Mein, 1990). On the other hand, Peris et al., 2003b found negative variation values (after–before) in TT in Manchega ewes at 36 and 42 kPa, even when overmilking of 1.5–2 min took place. In this experiment, an increase was found (0.11 cm) in TWT after milking measured by sonography and a drop (–0.06 cm) in TT measured by cutimeter. These differences found between the ultrasonography and cutimeter values are due to the fact that the increase in teat thickness after machine milking, when estimated by cutimeter, is almost exclusively due to the oedematization of the teat provoked during milking, as the pressure exerted by the plates of the device forces the re-evacuation of the blood accumulated in the teat, thus diminishing the congestion that may have been caused (Hamann and Mein, 1990). In the case of ultrasonography, as there is no pressure on the teat the measurement would include the congestion caused, possibly giving rise to higher TWT values after milking compared to the pre-milking values (Díaz et al., 2013).

Although ultrasonography estimated a positive variation in thickness, whereas with the cutimeter the variation was negative, a high and positive significant correlation was obtained for all the variables (TWT, TWA y TEWA) between these two methods. The highest value ( $r=0.65$ ) was found between TWT and TT before milking. Although the post-milking values and those of the difference showed a better correlation, the coefficient of correlation was always higher than 25. This agrees with the findings of Ambord and Bruckmaier, 2010, who found an  $r=0.71$  and  $r=0.85$ , between the TWT and the teat thickness measured by cutimeter before and after mechanical milking in cows,

and with that reported by Díaz et al., 2013, in Murciano-Granadina goats, with  $r$  values of 0.69 and 0.60 with TWT before and after milking. The high correlation with the cutimeter results shows that sonography can be applied as a very useful method to estimate the teat thickness variation in sheep caused by machine milking, and can also be used to detect anomalies and/or analyse teat structures and tissues.

## 5. Conclusions

Application of the ultrasound technique in ewes proved to be a suitable method to estimate the variations in teat tissues caused by machine milking in Manchega breed ewes. Moreover, taking into account the ease with which ultrasound teat examinations can be carried out on the farm and the clarity of the images taken, the 5 and 7.5 MHz frequencies may be considered the most suitable for estimating the effect of mechanical milking on teat wall thickness in this breed of sheep. In this sense, ultrasound scanning of the teat as a method of estimating the possible negative effects of the milking machine on teat status could be implemented as a veterinary routine on farms, in a similar way to other veterinary services such as the California Mastitis Test or gestation detection by ultrasound. Furthermore, given that the degree of experience of the operator in selecting and measuring the image can have an affect on the measurements taken in ultrasound frames, further studies would be necessary to allow the development of software to choose and measure the frames automatically to help reduce the subjective effect of the operator on the measurement of ultrasound variables.

## Conflict of interest

None declared.

## Acknowledgements

The authors are grateful to Patrice Emery (ECM, France) for his collaboration and lending the ultrasound material used in this work.

The study was supported by Project AGL2006-06909 (Ministerio de Educación y Ciencia and FEDER).

## References

- Ambord, S., Bruckmaier, R.M., 2010. Milk flow-dependent vacuum loss in high-line milking systems: effects on milking characteristics and teat tissue condition. *J. Dairy Sci.* 93, 3588–3594.
- Bruckmaier, R.M., Blum, J.M., 1992. B-mode ultrasonography of mammary glands of cows, goats and sheep during  $\alpha$ - and  $\beta$ -adrenergic agonist and oxytocin administration. *J. Dairy Res.* 59, 151–159.
- Cartee, R., Ibrahim, A., Mc Leary, D., 1986. B-mode ultrasonography of the bovine udder and teat. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 188 (11), 1284–1287.
- Díaz, J., Alejandro, M., Peris, C., Fernández, N., 2013. Use of ultrasound scanning to estimate teat wall thickness in Murciano-Granadina goats. *Livestock Sci.* 155, 114–122.
- Fahr, R.-D., Schulz, J., Rosner, F., 2001. Milking associated changes of the teat end in goats. In: *Tierarztl Prax Ausg G Grosstiere Nutztiere*, pp. 151–156.
- Fasulkov, I.R., Georgiev, P.I., Antonov, A.L., Atanasov, A.S., 2010. B-mode ultrasonography of mammary glands in goats during the lactation period. *Bulg. J. Vet. Med.* 13, 245–251.

- Forsbäck, L., Älveby, N., Svennersten-Sjaunja, K., 2005. Methods to measure teat condition in relation to machine milking with two different liners. In: Tancin, V., Mihina, S., Uhrincat, M. (Eds.), ICAR Technical Series No. 10. Physiological and Technical Aspects of Machine Milking. ICAR, Rome, Italy, pp. 219–220.
- Franz, S., Floek, M., Hofmann-Parisot, M., 2009. Ultrasonography of the bovine udder and teat. *Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract.* 25 (3), 669–685.
- Franz, S., Hofmann-Parisot, M., Baumgartner, W., Windischbauer, G., Suchy, A., Bauder, B., 2001. Ultrasonography of the teat canal in cows and sheep. *Vet. Rec.* 149, 109–112.
- Franz, S., Hofmann-Parisot, M., Gutler, S., Baumgartner, W., 2003. Clinical and ultrasonographic findings in the mammary gland of sheep. *N. Z. Vet. J.* 51, 238–243.
- Franz, S., Hofmann-Parisot, M., Baumgartner, W., 2004. Evaluation of three-dimensional ultrasonography of the bovine mammary gland. *Am. J. Vet. Res.* 65, 1159–1163.
- Gleeson, D.E., O'callaghan, E.J., Rath, M.V., 2002. Effect of milking on bovine teat tissue as measured by ultrasonography. *Ir. Vet. J.* 55, 628–632.
- Hamann, J., Mein, G.A., 1990. Measurement of machine-induced changes in thickness of the bovine teat. *J. Dairy Res.* 57, 495–505.
- Hamann, J., Mein, G.A., Nipp, B., 1996. Recommended method for measuring changes in thickness of the bovine teat with spring-loaded calipers. *J. Dairy Res.* 63, 309–313.
- Hillerton, J., Pankey, J., Pankey, P., 2002. Effect of over-milking on teat condition. *J. Dairy Res.* 69, 81–84.
- Isaksson, A., Lind, O., 1992. Teat reactions in cows associated with machine milking. *J. Vet. Med. Series A.* 39, 282–288.
- Klein, D., Flock, M., Khol, J., Franz, S., Stuger, H., Baumgartner, W., 2005. Ultrasonographic measurement of the bovine teat: breed differences, and the significance of the measurements for udder health. *J. Dairy Res.* 72, 296–302.
- Manzur, A., Díaz, J.R., Mehdid, A., Fernández, N., Peris, C., 2012. Effect of mid-line or low-line milking systems on milking characteristics in goats. *J. Dairy Res.* 79, 375–382.
- Mein, G.A., Neijenhuis, F., Morgan, W.F., Reinemann, D.J., Hillerton, J.E., Baines, J.R., Ohnstad, I., Rasmussen, M.D., Timms, L., Britt, J.S., Farnsworth, R., Cook, N., Hemling, T., 2001. Evaluation of bovine teat condition in commercial dairy herds: 1. Non-infectious factors. In: American Association of Bovine Practitioners National Mastitis Council. International Symposium on Mastitis and Milk Quality Proceedings, Vancouver, British Columbia, Canada, pp. 347–351.
- Neijenhuis, F., Klungel, G.H., Hogeveen, H., 2001. Recovery of cow teats after milking as determined by ultrasonography scanning. *J. Dairy Sci.* 84 (12), 2599–2606.
- O'Shea, J., 1987. Machine milking factors affecting mastitis – a literature review. In: Machine Milking and Mastitis. *Int. Dairy Fed. Bull.* 215, 5–28.
- Paulrud, C.O., Clausen, S., Andersen, P.E., Rasmussen, M.D., 2005. Infrared thermography and ultrasonography to indirectly monitor the influence of liner type and overmilking on teat tissue recovery. *Acta Vet. Scand.* 46, 137–147.
- Peris, C., Díaz, J.R., Segura, C., Martí, A., Fernández, N., 2003a. Influence of pulsation rate on udder health and teat thickness changes in dairy ewes. *J. Dairy Sci.* 86 (2), 530–537.
- Peris, C., Díaz, J.R., Balasch, S., Beltrán, M.C., Molina, M.P., Fernández, N., 2003b. Influence of vacuum level and overmilking on udder health and teat thickness changes in Dairy ewes. *J. Dairy Sci.* 86, 3891–3898.
- Persson, K., 1991. Microcirculation in the bovine teat skin, measured by Laser Doppler flowmetry. *Acta Vet. Scand.* 32, 131–133.
- Sinapis, E., Marnet, P.G., Skapetas, B., Hatziminaoglou, I., 2006. Effect of vacuum level on milking efficiency, somatic cell counts (SCC) and teat end wall thickness in ewes of Greek Mountain Boutsiko breed. *Livestock Sci.* 104, 128–134.
- Skapetas, B., Katanos, J., Laga, V., Sinapis, E., Hatziminaoglou, I., 2008. Vacuum level for opening the teat sphincter and the change in the teat end wall thickness in response to the machine milking of indigenous Greek goats. *Czech J. Anim. Sci.* 53 (3), 112–118.
- Ślósarz, P., Wójtowski, J., Bielińska, S., Frąckowiak, A., Ludwiczak, A., Krzyżewski, J., Bagnicka, E., Strzałkowska, N., 2010. Machine induced changes of caprine teats diagnosed by ultrasonography. *Afr. J. Biotechnol.* 9 (50), 8698–8703.
- Tamburini, A., Bava, L., Piccinini, R., Zecconi, A., Zucali, M., Sandrucci, A., 2010. Milk emission and udder health status in primiparous dairy cows during lactation. *J. Dairy Res.* 77, 13–19.
- Weiss, D., Weinfurter, M., Bruckmaier, R.M., 2004. Teat anatomy and its relationship with quarter and udder milk flow characteristics in dairy cows. *J. Dairy Sci.* 87, 3280–3289.
- Wójtowski, J., Ślósarz, P., Bielińska, S., Nowicki, S., Gut, A., Danków, R., 2006. Ultrasound image of morphological changes of teat end in sheep caused by machine milking. *Arch. Tierz. Dummerstorf* 49 (Special issue), 231–237.

**4.3. Infrared thermography as a tool to determine teat tissue changes caused by machine milking in Murciano-Granadina goats.**

Alejandro, M., Romero, G., Sabater, J.M. y Diaz, J.R.,

Livestock Science, 2014 - 160: 178-185

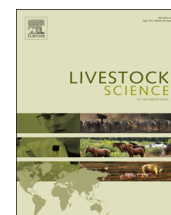
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.livsci.2013.11.029>





Contents lists available at ScienceDirect

## Livestock Science

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/livsci](http://www.elsevier.com/locate/livsci)

## Infrared thermography as a tool to determine teat tissue changes caused by machine milking in Murciano-Granadina goats

M. Alejandro<sup>a</sup>, G. Romero<sup>a</sup>, J.M. Sabater<sup>b</sup>, J.R. Díaz<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Departamento de Tecnología Agroalimentaria. Escuela Politécnica Superior de Orihuela, Universidad Miguel Hernandez, Ctra. Beniel, Km. 3,2, 03312 Orihuela, Alicante, Spain

<sup>b</sup> Departamento de Ingeniería de Sistemas y Automática, Universidad Miguel Hernandez, Avda de la Universidad s/n, Edificio Quorum V, 03202 Elche, Spain

## ARTICLE INFO

## Article history:

Received 5 July 2013

Received in revised form

26 November 2013

Accepted 30 November 2013

## Keywords:

Teat

Infrared thermography

Udder temperature

Ultrasound

Milking

## ABSTRACT

Given the scant information found in the review of the literature on the use of infrared thermography as a method to estimate the variation in teat tissue thickness caused by machine milking in goats, this work was proposed with a threefold objective: (1) to fine tune the temperature measuring technique for thermographic images; (2) study the effects of mammary gland health status in application of the technique; and (3) study the relationship between thermography and ultrasound scanning as methods for estimating the effect of machine milking on teat wall thickness. Thermographic images were taken in both glands, along with ultrasound scans of both teats, in 30 Murciano-Granadina goats from different parturition numbers, before and after milking, classifying the animals according to mammary gland health status (FREE: Somatic cell count (RCS) < 1,000,000 cells/mL and negative bacteriology; INF: infected, positive bacteriology; UNS: unspecific mastitis, RCS > 1,000,000 cells/mL and negative bacteriology). In the graphic images, we determined the temperature ( $T$ ) at specific points ( $P$ ) and areas ( $A$ ) of the teat (at the tip; TPP; at 1 cm: TP1 and AP1; at 2 cm: TP2 and AP2; at 3 cm: TP3 and AP3 from the teat end) and in the udder (TPU and TAU). The teat wall thickness (TWT), teat wall area (TWA) and teat-end wall area (TEWA) in the ultrasound images of the teat were also determined. Mechanical milking caused a significant increase ( $P < 0.05$ ) of the mean temperature by 6.6, 4.9, 2.5 and 1.5 °C at the tip, 1, 2, and 3 cm from the teat end. No differences were found between the point and area methods in estimating temperature changes in the teat caused by machine milking, and the measurements taken at 3 cm from the teat end are considered the most suitable for this calculation, as they were not affected by the mammary gland health status: UNS glands presented a lower temperature at 1 and 2 cm from the teat end before milking and the greater temperature difference after milking compared to the pre-milking values. Similarly, although mechanical milking caused an increase in temperature and teat wall thickness, a significant correlation, in this case negative, was only found between both variables at the teat end and at 1 and 2 cm from the tip in the UNS glands before and after milking.

Depending on the results found, thermography can detect teat temperature increases caused by machine milking. Nevertheless, further works are necessary to study which infectious and non-infectious factors related with the animal or the milking machine, among other aspects, could affect application of the thermography technique in goat

\* Corresponding author.

E-mail address: [jr.diaz@umh.es](mailto:jr.diaz@umh.es) (J.R. Díaz).



livestock. These studies would also allow us to determine the temperature increase threshold after milking after which damage to teat integrity might occur.

© 2013 Elsevier B.V. All rights reserved.

## 1. Introduction

Mechanical milking can cause circulatory changes (congestion and/or oedema) in teat tissue fluids, producing an increase in teat wall thickness and teat skin temperature (Hamann et al., 1994). These changes are of short duration when milking is carried out in suitable conditions, and are completely reversible within short time periods (Isaksson and Lind, 1992). However, milking performed with unsuitable parameters, such as excessive vacuum levels (Hamann et al., 1993), faulty or absent pulsation (Capuco et al., 1994; Mein et al., 2001), inappropriate pulsation rate (Hamann and Mein, 1996) or overmilking (Hillerton et al., 2002), can lead to persistence or high magnitudes of these circulatory changes, which in turn can affect local defence mechanisms, increasing the risk of new intramammary infections (O'Shea, 1987).

High positive or negative variations in teat end thickness ( $> +5\%$  and  $< -5\%$ ) can be a predisposing factor of intramammary infections (Zecconi et al., 1996). In goats, a greater teat wall thickness measured by cutimetre has been observed, associated with higher somatic cell counts (SCC  $> 1$  million cells/ml; Fahr et al., 2001).

Methods used to gauge teat thickness in goats include non-invasive techniques such as the cutimetre (Fahr et al., 2001; Skapetas et al., 2008) and ultrasound scanning (Díaz et al., 2013; Ślósarz et al., 2010), the latter being a very useful tool to determine changes brought about by mechanical milking (Díaz et al., 2013).

The use of infrared thermography (IRT) is deemed as a feasible, fast and non-invasive technique for detecting temperature changes in the udder and teat (Hamann et al., 1994). The changes in teat fluid circulation caused by machine milking in bovine trigger a temperature increase in teat skin temperature varying between 0.8 and 2 °C (Hamann and Dück, 1984; Isaksson and Lind, 1994; Paulrud et al., 2005; Vegricht et al., 2007). This increase may be the result of circulatory changes in the teat walls caused by mechanical treatment of the teat in the teatcup (Hamann and Dück, 1984), by milk flow through the teat cistern, by decreased teat capacity to dissipate surface heat when encased inside the teatcup, and finally, by a cutaneous vascular plexus response and an increase in blood flow (active hyperaemia; Isaksson and Lind, 1994).

In practice, IRT could be used as a quick method to estimate whether mechanical milking is performed correctly, as milking machine malfunction, improper use of its components or an unsuitable milking routine may be associated with a greater increase in teat skin temperature after milking. IRT has been used in bovine to study the effect of overmilking (5 min vs. automatic vacuum shut-off valve at 300 g/min) using different liners (soft and extended liner with high mounting tension and different mouthpiece height) on teat temperature and recovery

time (Paulrud et al., 2005), to estimate the impact of different milking equipment (Vegricht et al., 2007), as well as to compare machine milking with natural calf weaning at different ages (Knizkova et al., 2005). In sheep, the technique has been used to assess different vacuum levels (Stelletta et al., 2007). Paulrud et al. (2005) reported that the effect of machine milking on teat integrity can be monitored by comparing the real or relative temperature of a teat with the temperature of the adjacent teats.

IRT is able to detect udder skin temperature increases between 1–1.5 °C (Hovinen et al., 2008) caused by clinical mastitis in bovine; moreover, the sensitivity and specificity of the technique for the detection of subclinical mastitis is similar to that of the California mastitis test (Polat et al., 2010).

When analysing teat temperature changes caused by machine milking or mastitis, different authors have proposed different areas (teat end, middle and base) and sizes of the same for carrying out measurements, both in bovine (Barth, 2000; Hamann and Dück, 1984; Hovinen et al., 2008; Pezeshki et al., 2011; Paulrud et al., 2005; Vegricht et al., 2007) and ovine (Stelletta et al., 2007).

Given the paucity of information found in the review of the literature on the use of infrared thermography as a method to assess the circulatory changes in teat tissue fluids caused by machine milking in goats, this work was proposed with a threefold objective: (1) to fine tune the temperature measuring technique for thermographic images; (2) study the effect of mammary gland health status in application of the technique; (3) study the relationship between thermography and ultrasound scanning as methods for estimating the effect of machine milking on teat wall thickness.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Animals, housing and management

The trials were carried out on a commercial farm (Granja Pomares) located in the municipal area of Crevillente (Alicante, Spain). 30 Murciano-Granadina goats were used, kept in loose housing, with access during the day to the exercise pens. The goats were milked once daily, always in the mornings. The milking installations were in Low Line (LL;  $2 \times 24 \times 48$ ), with teatcups and silicon liners (Top Flow Z; Gea Farm Technologies, Bönen, Germany). The milking parameters used in the experiment were vacuum level 40 kPa (VL); pulsation rate 90 ppm (PR) and 60% pulsation ratio (PRT).

The machine milking routine for the animals consisted of teatcup attaching, mechanical milking and teatcup removal. Finally, after milking teats were immersed in an iodine solution.

Thermographic and ultrasound scans were performed in the milking parlour. The animals were standing and

scans were performed from animal's caudal part, using the following protocol: first, thermographic images were recorded of each gland before milking at a distance of 1 m from the animal. Ultrasound scans were then performed on each gland. Next, a sterile milk sample was taken from each gland for bacteriological analysis and milk samples were then taken from each gland to determine the SCC. The animals were then milked before recording thermographic images of the glands and carrying out the ultrasound scans.

The milking parlour ambient temperature varied from 15.3 to 16.9 °C, while the relative humidity was between 44% and 41%, between the beginning and end of sampling, respectively.

## 2.2. Somatic cell count (SCC)

Fifty microlitres of sodium azide (azidiol) were added to each milk sample (50 ml) collected for SCC. These samples were sent to LICOVAL (Interprofessional Dairy Laboratory, Valencian Community) for analysis in accordance with standard *ISO/FIL, 2006* (fluoro-opto-electronic method: Fossomatic-5000; Foss-Electric SA).

## 2.3. Bacteriological analysis

Bacteriological analysis was carried out previous to milking, from samples of milk obtained of teats carefully cleaned with 70% ethanol, discarding the first three streams of foremilk. Approximately 5 mL of milk were collected aseptically from each gland. Samples were kept at 4 °C for a maximum of 6 h until bacteriological analysis. Twenty microlitres of each sample were plated on blood agar plates (5% washed sheep erythrocytes; Biomerieux, Lyon, France). The plates were incubated aerobically at 37 °C and examined at 24 h, 48 h and 72 h. Cultures with five or more identical colonies were considered positive for INF.

Definition of health status (HS) of the mammary gland: in order to determine HS both the SCC and the results from the bacteriological analysis were considered. In this way, if a gland had infection it was classified as INF or if the glands did not have INF and the SCC was higher than 1,000,000 cells/mL, it was considered that the high SCC could be due to unspecific causes (UNS) (Díaz et al., 2012). Finally if a gland did not have INF and SCC was lower than 1,000,000 cells/mL, it was considered as FREE.

## 2.4. Thermographic images

These thermographic camera used was a FLUKE model Ti50FT IR Flexcam® (Fluke Corporation, Everett-Washington, USA), at 0.07 °C thermal sensitivity; 60 Hz frequency; detector 320 × 240; temperature range from –20 to +600 °C.

The thermographic images recorded were processed using SmartView 3.2 software (Fluke Corporation, Everett-Washington, USA). To determine the temperature of the thermal images, different measurements were taken:

*In teat:* as it is not always possible to distinguish the base of the teat in Murciano-Granadina goats, we decided to trace a line through the middle of the teat, from the teat

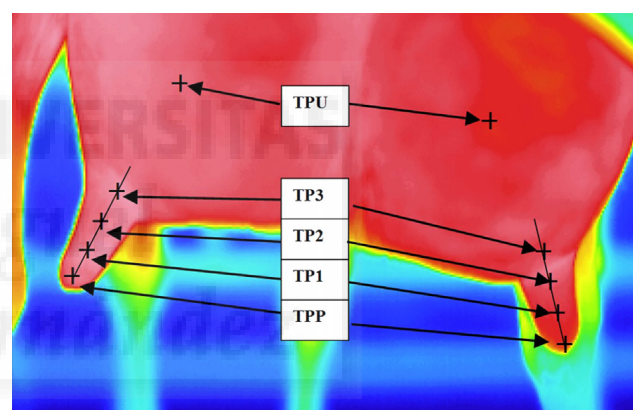
end to a length of 3.5 cm, and four points were placed over the line: at the teat tip (TPP), at 1 cm (TP1), 2 cm (TP2) and 3 cm (TP3) from the end, and the temperature from these points was recorded (Fig. 1).

Then, a circular area of 0.5 cm<sup>2</sup> was positioned at 1 cm (TA1), a 1 cm<sup>2</sup> area was positioned at 3 cm (TA3) and a third area was placed between the two previous ones (TA2). Minimum, maximum and mean temperature values were obtained in these areas (Fig. 2).

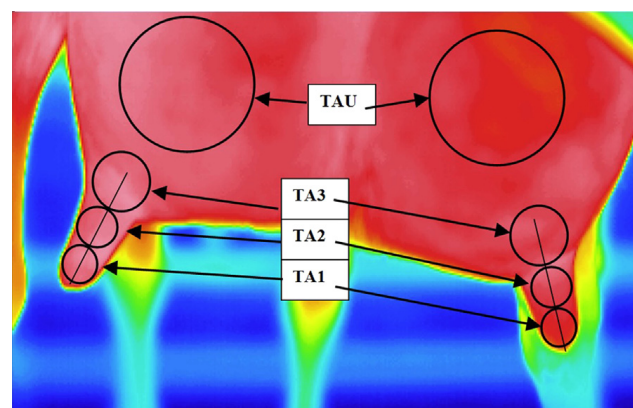
*In udder:* a 5 cm<sup>2</sup> circular area (TAU) was placed at the centre of the gland (Fig. 2), and a point was placed in the centre of the area (TPU) (Fig. 1).

## 2.5. Ultrasound scans

Ultrasound scanning of the two glands followed the methodology described by Díaz et al. (2013). A portable ultrasound unit (Agroscan AL, ECM, Noveko International Inc., France) was used, equipped with a 5 MHz linear probe: the sonographic images obtained were recorded on a PC and selected using Windows Movie Maker



**Fig. 1.** Temperature measured at different points of teat and udder in thermographic images of goat mammary glands. TPP: teat end temperature; TP1: temperature at 1 cm from teat end; TP2: temperature at 2 cm from teat end; TP3: temperature a 3 cm from teat end. TPU: udder temperature.



**Fig. 2.** Temperature measured at different areas of teat and udder in thermographic images of goat mammary glands. TA1: area at 1 cm from teat end; TA2: area at 2 cm from teat end; TA3: area at 3 cm from teat end; TAU: area in udder.



(Microsoft Corporation, USA). From the images obtained, the best one from each gland was chosen for subsequent processing using an IT programme designed for the purpose by the research team (ECOTEAT<sup>®</sup>) and the following measurements were selected: teat wall thickness (TWT, mean value of the two walls observed, cm), teat walls area (TWA, cm<sup>2</sup>) and teat end area (TEWA, cm<sup>2</sup>).

## 2.6. Statistical analysis

The association between the explanatory variables and the udder and teat temperatures was assessed using a least squares general linear procedure. Factors and first-order interaction terms significant at a  $P$ -value  $< 0.05$  were included in the final model (PROC MIXED, SAS Institute Inc, V.9.1. 2002). Temperature was included as outcome variable and the following as explanatory variables: method (MET: two levels, 1: points; 2: areas); measurement (MES: four levels, 1: 1 cm; 2: 2 cm; 3: 3 cm; 4: udder) hierarchised to MET; moment (MOM: two levels, 1: before milking; 2: after milking) and interaction MOM  $\times$  MES (MET). Another analysis was performed independently for the points method, considering the values obtained before and after milking, including the following factors MOM and MES, in this case with five levels (MES: five levels, 0: teat tip; 1: 1 cm; 2: 2 cm; 3: 3 cm; 4: udder) and MOM  $\times$  MES. The gland was considered as a random term in both cases.

To study the effect of MET and MES on the difference between values found before and after milking, a PROC GLM (SAS Institute Inc, V.9.1. 2002) was carried out, including the following factors in the model: MET and MES hierarchised to MET.

To study the effect of HS on the mean values of the observation at each of the points and areas before and after milking a PROC MIXED (SAS Institute Inc, V.9.1. 2002) was used, including the following factors: MOM, HS: Health status (HS, three levels: FREE; INF and UNS) and the MOM  $\times$  HS interaction. The gland was considered as random term in both cases.

To study the effect of HS on the temperature difference between pre- and post-milking, the values observed for the points and areas method were analysed independently using PROC GLM (SAS Institute Inc, V.9.1. 2002), including the following factors: HS, MES and HS  $\times$  MES.

The relationship between temperatures of different points and areas with TWT, TWA and TEWA obtained before and after milking and the differences between both periods were studied using the coefficient of correlation (PROC CORR, SAS Institute Inc., V.9.1., 2002).

## 3. Results

MOM, MES(MET) and MOM  $\times$  MES(MET) had a significant effect on teat and udder temperature, whereas MET had no effect.

Teat and udder temperature values according to the method and time of measurement are shown in Table 1. No significant differences were found before and after milking or in the difference (pre- and post-milking) between the temperatures obtained with the points and areas method at 1, 2 and 3 cm from the teat end and in the udder.

Pre- and post-milking temperature values measured in both methods were significantly greater in the udder than in the teat ( $P < 0.05$ ). On the other hand, we observed that both before and after milking the average teat temperature rose significantly ( $P < 0.05$ ) the nearer the reading was taken to the teat base, recording the highest temperature at 3 cm from the teat end (TP3) with both methods, whereas the lowest temperature was registered at the teat end with the points method (TPP, 24.1 °C and 30.7 °C before and after milking, respectively; data not shown) and at 1 cm from the point in the areas method (TA1). When analysing the temperature differences (after-before milking), we found that the greatest difference occurred in the teat end with the points method (6.60 °C; data not shown) and at 1 cm from the teat end with the areas method (4.92 °C). In this sense, we should note that with the points and areas methods no significant differences

**Table 1**

Mean temperature values (°C) in udder and teat according to the thermal image measurement method (areas and points) and measurement time (before and after milking) and the difference between these values.

Measure time	Method	Teat			Udder	P
		1 cm	2 cm	3 cm		
Before milking (a)	Point	28.33 $\pm$ 0.26a	31.71 $\pm$ 0.26b	33.19 $\pm$ 0.26c	34.33 $\pm$ 0.26d	***
	Area	28.39 $\pm$ 0.26a	31.54 $\pm$ 0.26b	33.18 $\pm$ 0.26c	34.32 $\pm$ 0.26d	***
	P	ns	ns	ns	ns	
After milking (b)	Point	33.28 $\pm$ 0.26a	34.14 $\pm$ 0.26b	34.64 $\pm$ 0.26b	35.93 $\pm$ 0.26c	***
	Area	33.31 $\pm$ 0.26a	34.11 $\pm$ 0.26b	34.64 $\pm$ 0.26b	35.92 $\pm$ 0.26c	***
	P	ns	ns	ns	ns	
Difference (b – a)	Point	4.94 $\pm$ 0.31a	2.43 $\pm$ 0.31b	1.45 $\pm$ 0.31c	1.61 $\pm$ 0.31bc	*
	Area	4.92 $\pm$ 0.31a	2.56 $\pm$ 0.31b	1.46 $\pm$ 0.31c	1.60 $\pm$ 0.31c	*
	P	ns	ns	ns	ns	

ns: non-significant ( $P > 0.05$ ).

a,b,c,d: Different letters in the same row indicate differences between columns.

\*  $P < 0.05$ .

\*\*\*  $P < 0.001$ .

**Table 2**

Mean temperature values (°C) in udder and teat determined by points method before milking (1), after milking (2) and the difference between both values ( $D=2-1$ ), according to mammary gland health status.

Point	Measure time	Health status						P
		FREE		INF		UNS		
		n		n		n		
TPP	Before	26	24.86 ± 0.68	14	23.74 ± 0.92	20	23.31 ± 0.77	ns
	After	26	30.60 ± 0.49	14	30.80 ± 0.67	20	30.72 ± 0.56	ns
	Difference	26	5.74 ± 0.53a	14	7.06 ± 0.72ab	20	7.40 ± 0.60b	*
TP1	Before	26	29.71 ± 0.68a	14	27.81 ± 0.92ab	20	26.90 ± 0.77b	*
	After	26	33.40 ± 0.35	14	33.56 ± 0.48	20	32.91 ± 0.40	ns
	Difference	26	3.68 ± 0.53a	14	5.75 ± 0.72b	20	6.01 ± 0.60b	*
TP2	Before	26	32.57 ± 0.49a	14	31.51 ± 0.65ab	20	30.73 ± 0.56b	*
	After	26	34.28 ± 0.25	14	34.30 ± 0.34	20	33.86 ± 0.28	ns
	Difference	26	1.71 ± 0.53	14	2.78 ± 0.72	20	3.12 ± 0.60	ns
TP3	Before	26	33.55 ± 0.35	14	33.30 ± 0.47	20	32.66 ± 0.39	ns
	After	26	34.98 ± 0.25	14	34.56 ± 0.35	20	34.26 ± 0.30	ns
	Difference	26	1.44 ± 0.53	14	1.26 ± 0.72	20	1.60 ± 0.60	ns
TPU	Before	26	34.56 ± 0.28	14	34.60 ± 0.39	20	33.83 ± 0.32	ns
	After	26	36.34 ± 0.22a	14	35.72 ± 0.31ab	20	35.56 ± 0.26b	*
	Difference	26	1.78 ± 0.53	14	1.11 ± 0.72	20	1.73 ± 0.60	ns

TPP: teat end temperature; TP1: temperature at 1 cm from teat end; TP2: temperature at 2 cm from teat end; TP3: temperature at 3 cm from teat end. TPU: udder temperature.

FREE (negative bacteriology and SCC < 1,000,000 cells/mL); INF: infected animals (positive bacteriology); UNS (RCS > 1,000,000 cells/mL and negative bacteriology).

a,b: Different letters indicate significant differences between columns; ns: non-significant ( $p > 0.05$ ); n: number of cases.

\*  $P < 0.05$ .

were found between the temperature difference in the udder and at 3 cm from the teat end.

Temperatures measured in teat and udder recorded before and after milking according to mammary gland health status are shown in Tables 2 (points method) and 3 (areas method). Before milking, the FREE glands presented a higher temperature value in TP1, TP2, TA1 and TA2 than UNS glands. Likewise, the temperature difference in TP1 and TA1 is lower in FREE glands than in INF and UNS. If we consider TA2, the difference in temperatures in the FREE glands is still lower than in UNS, but similar to INF. Although in TA3 significant differences were observed after milking between FREE and UNS glands, in TP3 no significant differences were found in any of the variables. Moreover, in TP3 and in TA3 no significant differences were found in the temperature difference values recorded before and after milking.

Before milking in TA1 and TA2, FREE glands presented higher maximum and minimum temperatures than UNS glands, but similar to INF (data not shown). After milking in TA3, the maximum temperature is higher in FREE glands compared to UNS glands.

In the udder (TPU and TAU), no significant differences were found in the temperatures taken before milking, nor in the differences between pre- and post-milking, although it was observed that after milking the FREE glands had higher mean and maximum temperatures in the udder than in the UNS glands.

Analysing the total values (Table 4), we see that there is a negative and significant correlation between the TWT values before milking and the temperatures at the tip and at 1 and 2 cm from the teat tip, although no significant

correlation was found at 3 cm from the teat end. The highest correlation between the temperature and TWT was found at 1 cm from the teat end (TP1 and TA1). After milking and in the temperature differences between before and after milking, no significant correlation with TWT was found. Nor was any significant correlation of TWA and TEWA found with the temperatures observed at different points and areas, either before or after milking.

When analysing the correlation of the different values according to health status (data not shown), it was found that the significant correlation observed before milking with TWT is mainly due to the high correlation in the UNS glands ( $r = -0.51$ ) between TWT and all the temperature values, whereas in the FREE and INF glands no correlation was found between the temperatures and TWT.

#### 4. Discussion

The effect of mechanical milking on teat temperature has been studied by analysing the temperature changes at the end, middle and base of the teat (Hamann and Dück, 1984; Knizkova et al., 2005; Paulrud et al., 2005; Vegricht et al., 2007). In this study, no significant differences were found between the temperatures measured using the two methods proposed (points and areas) at the same distance from the teat end, either before or after milking. The points approach is a quick and simple method of gauging the temperature at different zones of the teat and udder. However, with definition of the areas it is possible to obtain more information, such as the average and maximum temperatures. Hovinen et al. (2008) found that the maximum temperature was related with rectal temperature,

**Table 3**

Mean temperature values (°C) in udder and teat determined by the areas method before milking (1), after milking (2) and the difference between both values ( $D=2-1$ ), according to mammary gland health status.

Area	Measure time	Health status						P
		n	FREE	n	INF	n	UNS	
TA1	Before	26	29.74 ± 0.67a	14	27.92 ± 0.92ab	20	26.98 ± 0.76b	**
	After	26	33.40 ± 0.34	14	33.50 ± 0.46	20	33.07 ± 0.38	ns
	Difference	26	3.66 ± 0.46a	14	5.57 ± 0.62b	20	6.09 ± 0.52b	*
TA2	Before	26	32.44 ± 0.50a	14	31.34 ± 0.68ab	20	30.52 ± 0.57b	*
	After	26	34.25 ± 0.24	14	34.16 ± 0.33	20	33.89 ± 0.28	ns
	Difference	26	1.81 ± 0.46a	14	2.82 ± 0.62ab	20	3.36 ± 0.52b	*
TA3	Before	26	33.55 ± 0.34	14	33.31 ± 0.47	20	32.62 ± 0.39	ns
	After	26	35.01 ± 0.25a	14	34.62 ± 0.34ab	20	34.17 ± 0.28b	*
	Difference	26	1.46 ± 0.46	14	1.31 ± 0.62	20	1.55 ± 0.52	ns
TAU	Before	26	34.53 ± 0.27	14	34.58 ± 0.37	20	33.85 ± 0.31	ns
	After	26	36.33 ± 0.21a	14	35.74 ± 0.28ab	20	35.50 ± 0.24b	*
	Difference	26	1.80 ± 0.46	14	1.56 ± 0.62	20	1.64 ± 0.52	ns

TA1: area at 1 cm from teat end; TA2: area at 2 cm from teat end; TA3: area at 3 cm from teat end; TAU: area in udder. FREE (negative bacteriology and SCC < 1,000,000 cells/mL); INF: infected animals (positive bacteriology); UNS (RCS > 1,000,000 cells/mL and negative bacteriology).

ns: non-significant ( $p > 0.05$ );

n: number of cases;

a,b: Different letters indicate significant differences between columns.

\*  $P < 0.05$ .

\*\*  $P < 0.01$ .

**Table 4**

Mean values of teat end (TEWA) and teat wall (TWT and TWA) thickness and their correlation coefficients with the temperature measured at different points and areas of the teat measured before milking (1), after milking (2) and the differences between both values ( $D=2-1$ ).

Ultrasound variables	Measure time	Ultrasound mean values		Temperatures (point and area method)						
		n	mean ± sd	TPP	TP1	TP2	TP3	TA1	TA2	TA3
TWT	Before	60	0.42 ± 0.08	-0.31*	-0.41**	-0.28*	-0.20	-0.41**	-0.31*	-0.22
	After	60	0.49 ± 0.07	0.21	0.12	-0.04	-0.05	0.13	-0.03	-0.02
	Difference	60	0.07 ± 0.09	0.06	-0.04	0.05	0.22	-0.05	0.03	0.24
TWA	Before	60	0.81 ± 0.10	-0.09	-0.17	-0.15	-0.13	-0.18	-0.17	-0.15
	After	60	0.89 ± 0.11	0.12	0.18	0.09	0.11	0.15	0.07	0.13
	Difference	60	0.07 ± 0.11	0.17	0.05	0.06	0.25	0.05	0.06	0.25
TEWA	Before	60	0.56 ± 0.16	0.14	0.14	0.13	0.08	0.13	0.13	0.09
	After	60	0.66 ± 0.18	-0.01	0.07	-0.05	0.05	0.03	-0.06	0.08
	Difference	60	0.09 ± 0.21	0.18	0.09	0.09	0.13	0.11	0.11	0.16

n: number of cases.

TWT: teat wall thickness (cm); TWA: teat walls area (cm<sup>2</sup>); TEWA: teat end area (cm<sup>2</sup>); TPP: temperature at teat end; TP1: temperature at 1 cm from teat end; TP2: temperature at 2 cm from teat end; TP3: temperature at 3 cm from teat end; TA1: area at 1 cm from teat end; TA2: area at 2 cm from teat end; TA3: area at 3 cm from teat end.

\* Significance level:  $P < 0.05$ .

\*\* Significance level:  $P < 0.01$ .

which was transiently increased in experimentally-induced clinical mastitis.

The temperature values TPP, TP1 and TP2 before milking are lower than those reported by Barth (2000) in cattle, whereas the TP3 before milking and TP1, TP2 and TP3 after milking are very similar to those obtained by Paulrud et al. (2005). Although Stelletta et al. (2007), in sheep, reported mean post-milking temperature values higher than those found in this work when using vacuum levels of 42 kPa, these differences cannot be explained in comparison with our experiment because in addition to using different species, these authors did not discuss the values found. In the case of udder temperature, the values are similar

to those found by Barth (2000), Colak et al. (2008) and Polat et al. (2010), in bovine. The lowest temperature in the teat was recorded at the tip, both before and after machine milking, similar to that found in bovine by other authors (Barth, 2000; Paulrud et al., 2005). Before and after milking, the teat temperature gradually increased ( $P < 0.05$ ) from the teat tip to the base, as reported by Barth (2000) in dairy cows. Machine milking caused a significant increase ( $P < 0.05$ ) in mean temperature of 6.6, 4.9, 2.5 and 1.5 °C at the tip and at 1, 2 and 3 cm from the teat end, respectively. According to Hamann and Dück (1984), the increase in teat skin temperature during milking is due to circulatory changes in the teat wall

induced by the mechanical treatment of the teat in the teatcup (liner compression). In this sense, [Isaksson and Lind \(1994\)](#) indicated that the increased temperature may be due to a response of the cutaneous vascular plexus and an increase in blood flow (active hyperaemia). During milking, muscle tone decreases, leading to opening of the anastomoses, which increases the blood flow and, in consequence, convective heat loss from the skin ([Paulrud et al., 2005](#)).

To study the effect of mechanical milking on teat skin surface temperature, it would be advisable to use areas or points that are not affected by mammary gland health status. In this paper, these areas would correspond to measurements taken in TP3 and TA3. The temperature of FREE glands was greater before milking at 1 cm (TP1 and TA1) and 2 cm (TP2 and TA2) from the teat end, and the difference in temperatures was lower. At gland level, no health status-dependent differences in surface temperature were observed before milking, although after milking it was noted that the FREE glands presented udder temperature similar to that of the INF glands, but higher than the UNS glands. In line with the above, these points could be used to study TIR as a mastitis estimation method, especially when due to non-specific causes, although further studies would be needed to check these results.

In bovine, several authors ([Barth, 2000](#); [Hovinen et al., 2008](#); [Pezeshki et al., 2011](#); [Polat et al., 2010](#)) have found a temperature increase in infected glands compared to healthy ones. These results differ from those found in this article, as the highest temperature values were observed in healthy glands before milking. Moreover, [Hovinen et al. \(2008\)](#) were able to correlate udder temperature with clinical mastitis, but could not distinguish between healthy and infected quarters.

In the published articles it is detailed that the temperature increase in the infected gland could be seen as of 3 h ([Pezeshki et al., 2011](#)) and 4 h ([Hovinen et al., 2008](#)) after mastitis induction (IM) with endotoxin of *Escherichia coli*, although an increase in temperature was also observed in the healthy glands at 4 h ([Hovinen et al., 2008](#)) and 12 h ([Pezeshki et al., 2011](#)) following IM. In goats and cows, [Dhondt et al. \(1977\)](#) found an increase in blood flow towards the udder after IM, with two peaks at 3 and 11 h. In these works, the gland temperature returned to pre-IM values within 24 h of the increase. This could explain why similar values were found in this work between FREE and INF glands, because having taken the measurements in an isolated experimental control means that the moment of infection is unknown; so it was not possible to record the temperature increases associated with heightened blood flow due to the infection.

Machine milking caused an increase in TWT, TWA and TEWA. The values of these variables before and after milking and of the differences between pre- and post-milking were similar to those found in the same breed and with the same ultrasound scanning frequency used ([Díaz et al., 2013](#)).

Although machine milking caused an increase in teat wall thickness and temperature, no significant correlation was found between the variables taken by ultrasound and the temperatures measured with TIR after milking or when considering the difference in the values between

pre- and post-milking. Nevertheless, a negative correlation of TWT was found with TPP, TP1, TP2, TA1 and TA2 before milking. As TWT was measured at 1 cm from the teat end, the highest correlation was also obtained 1 cm from the end ( $P < 0.01$ ;  $r = -0.41$ ). Analysing the correlations between the temperature and ultrasounds variables depending on the health status (data not shown), negative correlation was found in the UNS glands, but not in FREE or INF. It is possible that the high SCC found in the UNS may not be related to intramammary infections ([Zeng et al., 1997](#)) and could be due to other physiological factors that cause lower blood flow in the teat; or to an infection in the gland tissues that may be associated with chronic congestion and oedema of the teat end, so that the blood flow and temperature are reduced ([Hovinen et al., 2008](#)), as the UNS glands presented a greater TWT than FREE and INF glands (0.49, 0.39 and 0.44 cm; respectively, data not shown); or there may have been intramammary infection in the UNS and the aseptic milk samples taken on that day may not have presented a sufficient number of colonies to be classified as infected.

## 5. Conclusions

The points and areas methods fine tuned in this work may be suitable for estimating the temperature changes in teat and udder caused by mechanical milking, with the temperature measured at 3 cm (TP3 and TA3) from the teat end being the most appropriate to estimate the changes, as they are not affected by animal's health status. Although machine milking caused an increase in temperature and thickness in the teat end and walls, these variables are not correlated with each other in healthy glands, although a negative correlation of teat thickness with temperature was observed before milking in glands with non-specific mastitis. Depending on the results found, thermography can detect teat temperature increases caused by machine milking. Nevertheless, further works are necessary to study which infectious and non-infectious factors related with the animal or the milking machine, among other aspects, could affect application of the thermography technique in goat livestock. These studies would also allow us to determine the temperature increase threshold after milking after which damage to teat integrity might occur.

## Conflict of interest

None.

## Acknowledgements

The authors would like to thank Mr. David Colom Martínez from the company Panatec S.L., for his assistance in conducting the thermal imaging and interpreting the results and M. Patrice Emery (ECM, France) for his collaboration and lending the ultrasound material used in this work.

The study was supported by project AGL2006-06909 (Ministerio de Educación y Ciencia of Spain and FEDER/ERDF).



## References

- Barth, K., 2000. Basic investigations to evaluate a highly sensitive infrared-thermograph-technique to detect udder inflammation in cows. *Milchwiss. – Milk-Sci. Int.* 55, 607–609.
- Capuco, A., Mein, G., Nickerson, S., Jack, L., Wood, D., Bright, A., Aschenbrenner, R., Miller, R., Bitman, J., 1994. Influence of pulsationless milking on teat canal keratin and mastitis. *J. Dairy Sci.* 77, 64–74.
- Colak, A., Polat, B., Okumus, Z., Kaya, M., Yanmaz, L., Hayirli, A., 2008. Early detection of mastitis using infrared thermography in dairy cows. *J. Dairy Sci.* 91, 4244–4248.
- Dhondt, G., Burvenich, C., Peeters, G., 1977. Mammary blood flow during experimental *Escherichia coli* endotoxin induced mastitis in goats and cows. *J. Dairy Res.* 44, 433–440.
- Díaz, J.R., Alejandro, M., Peris, C., Fernández, N., 2013. Use of ultrasound scanning to estimate the teat wall thickness in Murciano-Granadine goat. *Livest. Sci.* 155, 114–122.
- Díaz, J.R., Romero, G., Muelas, R., Alejandro, M., Peris, C., 2012. Effect of intramammary infection on milk electrical conductivity in Murciano-Granadina goats. *J. Dairy Sci.* 95, 718–726.
- Fahr, R., Schulz, J., Rosner, F., 2001. Milking associated changes of the teat end in goats. [Melkbedingte Veränderungen an der Sitzenspitze der Ziege]. *Tierärztl. Prax* 29 (G), 151–156.
- Hamann, J., Burvenich, C., Mayntz, M., Osteras, O., Haider, W., 1994. Machine-induced changes in the status of the bovine teat with respect to the new infection risk. *Teat Tissue Reactions to Machine Milking and new Infection Risk*, vol. 297. IDF13–22.
- Hamann, J., Dück, M., 1984. Preliminary report on measurement of teat skin temperature using infrared thermography. *Milchpraxis* 22 (4), 148–152.
- Hamann, J., Mein, G., 1996. Teat thickness changes may provide biological test for effective pulsation. *J. Dairy Res.* 63, 179–189.
- Hamann, J., Mein, G., Wetzel, G., 1993. Teat tissue reactions to milking: effects of vacuum level. *J. Dairy Sci.* 76, 1040–1046.
- Hillerton, E., Pankey, J., Pankey, P., 2002. Effect of over-milking on teat condition. *J. Dairy Res.* 69, 81–84.
- Hovinen, M., Siivonen, J., Taponen, S., Hänninen, L., Pastell, M., Aisla, A., Pyörälä, S., 2008. Detection of clinical mastitis with the help of a thermal camera. *J. Dairy Sci.* 91, 4592–4598.
- Isaksson, A., Lind, O., 1992. Teat reactions in cows associated with machine milking. *J. Vet. Med.* 39, 282–288.
- Isaksson, A., Lind, O., 1994. Milking related changes in the surface temperature of the bovine teat skin. *Acta Vet. Scand.* 35 (4), 435–438.
- ISO/FIL (International Organization for Standardization), 2006. Milk. Enumeration of Somatic Cells. Part 2: Guidance on the Operation of Fluoro-Opto-Electronic Counters. ISO, Geneva, Switzerland (ISO 13366-2/IDF 148-2).
- Knizkova, I., Kunc, P., Broucek, J., Kisac, P., 2005. The effect of calf suckling and machine milking on bovine teats. *Physiological and Technical Aspects of Machine Milking*. In: Tancin, V., Mihina, S., Uhrincat, M., Proceedings of the International Conference held in Nitra, Slovak Republic, 26–28 April, pp 137–146.
- Mein, G.A., Neijenhuis, F., Morgan, W.F., Reinemann, D.J., Hilleron, J.E., Baines, J.R., Ohnstad, L., Rasmussen, M.D., Timms, L., Britt, J.S., Farnsworth, R., Cook, N., Hemling, T., 2001. Evaluation of bovine teat condition in commercial dairy herds: 1. Non-infectious factors. In: Proceedings of the American Association of Bovine Practitioners National Mastitis Council. International Symposium Mastitis and Milk Quality Proceedings, Vancouver, British Columbia, Canada, pp.347–351.
- O'Shea, J., 1987. Machine milking factors affecting mastitis. A literature review. In: Proceedings of the Machine Milking and Mastitis, IDF, vol. 215, pp. 5–28.
- Paulrud, C., Clausen, S., Andersen, P., Rasmussen, M., 2005. Infrared thermography and ultrasonography to indirectly monitor the influence of liner type and overmilking on teat tissue recovery. *Acta Vet. Scand.* 46, 137–147.
- Pezeshki, A., Stordeur, P., Wallemacq, H., Schynts, F., Stevens, M., Boutet, P., Peelman, L., Spiegeleer, B., Duchateau, L., Bureau, F., Burvenich, C., 2011. Variation of inflammatory dynamics and mediators in primiparous cows after intramammary challenge with *Escherichia coli*. *Vet. Res.* 42, 15.
- Polat, B., Colak, A., Cengiz, M., Yanmaz, L.E., Oral, H., Bastan, A., Kaya, S., Hayirli, A., 2010. Sensitivity and specificity of infrared thermography in detection of subclinical mastitis in dairy cows. *J. Dairy Sci.* 93 (8), 3525–3532.
- Skapetas, B., Katanos, J., Laga, V., Sinapis, E., Hatziminaoglou, I., 2008. Vacuum level for opening the teat sphincter and the change in the teat end wall thickness in response to the machine milking of indigenous Greek goats. *Czech J. Anim. Sci.* 53 (3), 112–118.
- Ślósarz, P., Wójtowski, J., Bielińska, S., Frąckowiak, A., Ludwiczak, A., Krzyżewski, J., Bagnicka, E., Strzałkowska, N., 2010. Machine induced changes of caprine teats diagnosed by ultrasonography. *Afr. J. Biotechnol.* 9 (50), 8698–8703.
- Stelletta, C., Murgia, L., Caria, M., Ganesella, M., Pazzona, A., Morgante, M., 2007. Thermographic study of the ovine mammary gland during different working vacuum levels. *Ital. J. Anim. Sci.* vol. 6 (Suppl. 1), 601.
- Vegricht, J., Machálek, A., Ambrož, P., Brehme, U., Rose, S., 2007. Milking-related changes of teat temperature caused by various milking machines. *Res. Agric. Eng.* 53 (4), 121–125.
- Zecconi, A., Bronzo, V., Piccinini, R., Moroni, P., Ruffo, G., 1996. Field study on the relationship between teat thickness changes and intramammary infections. *J. Dairy Res.* 63, 361–368.
- Zeng, S.S., Escobar, E.N., Popham, T., 1997. Daily variations in somatic cell count, composition, and production of Alpine goat milk. *Small Rumin. Res.* 26, 253–260.

**4.4. Effects of milk removal on teat tissue and recovery in Murciano-Granadina goats.**

Alejandro, M., Roca, A., Romero, G. y Diaz, J.R.,

Journal of Dairy Science, 2014 - 97: 5012-5016

DOI: <http://dx.doi.org/10.3168/jds.2014-7934>





## Short communication: Effects of milk removal on teat tissue and recovery in Murciano-Granadina goats

M. Alejandro, A. Roca, G. Romero, and J. R. Díaz<sup>1</sup>

Departamento de Tecnología Agroalimentaria, Escuela Politécnica Superior de Orihuela, Universidad Miguel Hernández, 03312 Orihuela, Alicante, Spain

### ABSTRACT

The aim of this work was to study how machine milking (MM) carried out in appropriate conditions affects teat wall thickness and canal length and their return after milking to premilking conditions compared with other milk removal methods considered biological referents: kid suckling (KS), catheter removal (CATH), and hand milking (HM). Three Latin square experiments were designed, each divided into 2 periods. In the first period, the left glands of each animal were machine milked and the KS, CATH, and HM treatments were applied to the right glands in experiments 1, 2, and 3, respectively. Subsequently, in the second period, the removal methods were interchanged. Teat wall thickness, teat wall area, teat end wall area, and teat canal length were measured from the ultrasound images. Milk removal using the reference methods (KS, CATH, and HM) and by MM caused increases in teat wall thickness and teat canal length, which were greater with MM. The time needed for the teat walls and canal to return to their physiological conditions before milk removal was greater than 10 h in the reference methods and following machine milking.

**Key words:** goat, teat recovery, congestion, ultrasonography, machine milking

### Short Communication

The mechanical forces applied to the teat during milking cause physiological changes in the teat tissues that may affect teat recovery time or its return to premilking physiology before milking (Neijenhuis et al., 2001). According to Hamann and Osteras (1994), the recovery time for teat tissue after calf suckling provides a biological reference to evaluate how teat tissue reacts to machine milking.

It is important to establish teat recovery time in order to determine the minimum interval between milkings. If one milking interval is insufficient for teat

tissue recovery, the circulatory changes in the teat tissues cannot return to their normal physiological status (Hamann and Osteras, 1994), which may result in irreversible chronic changes following the application of a frequent milking regimen (Hamann and Osteras, 1994; Neijenhuis et al., 2001). Recovery time depends on the milking system used (Hamann and Mein, 1990; Gleeson et al., 2002), as well as the liner compression (Spanu et al., 2008) and liner type (Paulrud et al., 2005). In small ruminants, teat wall thickness recovery time after conventional machine milking can exceed 10 h (Ślósarz et al., 2010; goats) and ranges from 4 to 10 h (Wójtowski et al., 2006; sheep).

Due to the scarce information available on the effect of different milk removal methods on teat status and recovery time in goats, the aim of this work was to study how machine milking (MM) affects teat wall thickness and teat canal length and their recovery following milking in normal physiological conditions compared with other milk removal methods considered referents: kid suckling (KS), milk removal by catheter (CATH), and hand milking (HM).

To achieve the objectives, 3 experiments with a Latin square design were carried out, using 12 goats in the first experiment (KS), 11 in the second (CATH), and 12 in the third (HM). Every experimental phase included 2 periods. In the first experimental period, the left gland of each goat was machine milked, whereas in the right gland the milk was removed by kid suckling (experiment 1), catheter (experiment 2), or hand (experiment 3). In the second experimental period, the gland group treatments (left and right) were interchanged. Each experimental period included 2 sampling days at the end. On these sampling days, ultrasound examinations were performed before milk removal (B), after removal (A), and at 1, 2, 3, 4, 6, 8, and 10 h after milk removal. The milking units used had teatcups with automatic vacuum shut-off valves and silicone liners (Top Flow Z; GEA Farm Technologies, Bönen, Germany). The milking parameters used were 40 kPa vacuum level, 90 pulsations/min, and 60% pulsation ratio.

Ultrasound scanning of the 2 glands followed the methodology described by Díaz et al. (2013). A por-

Received January 11, 2014.

Accepted April 4, 2014.

<sup>1</sup>Corresponding author: jr.diaz@umh.es



table ultrasound unit (Agroscan AL, ECM, Noveko International Inc., Angoulême, France) was used, equipped with a 5-MHz linear probe. For the examination, a transparent plastic recipient filled with water at 37°C was used. The probe was placed inside a latex bag filled with contact gel and contact gel was applied between the latex bag and the recipient. The images obtained were processed using a software program designed for the purpose by the research team (Ecoteat) and the following measurements were studied: teat wall thickness (**TWT**, mean value of the 2 walls examined, cm), area of the teat walls (**TWA**, cm<sup>2</sup>), teat end wall area (**TEWA**, cm<sup>2</sup>), and teat canal length (**TCL**, cm).

The association between the explanatory variables and teat tissue variables was assessed using a stepwise linear mixed model procedure (Proc Mixed of SAS software version 9.1; SAS Institute Inc., Cary, NC). Teat wall thickness, TWA, TEWA, and TCL measured before and after milking and their increments were included as outcome variables and the following as explanatory variables (model 1): treatment (2 levels, 1 = kid, catheter, or hand milking, depending on the experiment carried out; 2 = machine milking), period (2 levels, 1: first period; 2: second period), day nested in period (2 levels, 1: first day; 2: second day), and the interaction of period and treatment. Goat and gland (2 levels: right, left) nested in goat were considered as random terms. The model considered was

$$Y_{ijklmn} = \mu + \alpha_i + \beta_j + \gamma_k(\delta_l) + \alpha\beta_{ij} + \kappa_m(\varepsilon_n) + \varepsilon_n + e_{ijklmn}, \quad [1]$$

where  $Y_{ijklmn}$  is the dependent variable;  $\mu$  is the mean;  $\alpha_i$  is the effect of the  $i$ th treatment (reference method of each experiment or MM);  $\beta_j$  is the effect of the  $j$ th period (first or second);  $\gamma_k(\delta_l)$  is the effect of the  $k$ th experiment day (first or second) nested in the  $l$ th period (first or second);  $\alpha\beta_{ij}$  is the interaction between treatment and period;  $\kappa_m(\varepsilon_n)$  is the random effect of the  $m$ th gland (left or right) nested in the  $n$ th goat;  $\varepsilon_n$  is the random effect of the goat; and  $e_{ijklmn}$  is the residual error.

A similar modeling procedure was used to assess teat recovery in each of the treatments assayed in each experiment. As a result, the final model included TWT, TWA, TEWA, and TCL as the outcome variables and the following explanatory variables (model 2): moment (9 levels, -1 = before, 0 = after, 1, 2, 3, 4, 6, 8, and 10 h after milking); period (2 levels, 1: first period and 2: second period), and day nested in period (2 levels, 1: first day; 2: second day). Goat and gland nested in goat were considered as random terms. The model considered was

$$Y_{ijklmn} = \mu + \alpha_i + \beta_j + \gamma_k(\delta_l) + \kappa_m(\varepsilon_n) + \varepsilon_n + e_{ijklmn}, \quad [2]$$

where  $Y_{ijklmn}$  is the dependent variable;  $\mu$  is the mean;  $\alpha_i$  is the effect of the  $i$ th moment (-1, 0, 1, 2, 3, 4, 6, 8, 10 h);  $\beta_j$  is the effect of the  $j$ th period (first or second);  $\gamma_k(\delta_l)$  is the effect of the  $k$ th experiment day (first or second) nested in the  $l$ th period (first or second);  $\kappa_m(\varepsilon_n)$  is the random effect of the  $m$ th gland (left or right) nested in the  $n$ th goat;  $\varepsilon_n$  is the random effect of the goat; and  $e_{ijklmn}$  is the residual error. Milk yield and milking time were not included as covariables in the final model because they had no significant effect.

Table 1 shows the value of the variables measured by ultrasound (TWT, TWA, TEWA, and TCL) before and after milking and their increments in each experiment. In experiment 1 (KS), MM caused a significant increase after milking in TWT, TWA, and TEWA ( $P < 0.001$ ) compared with KS, which resulted in an increment of the same variables. However, milk removal method had no effect on TCL. In experiment 2 (CATH), MM caused an increase in TWT, TWA, and TEWA ( $P < 0.05$ ) compared with CATH, although the increment in TWT was unaffected by treatment. The increase in TWA and TEWA was smaller with CATH compared with MM, and TCL was not affected by the milk removal method. In experiment 3 (HM), MM caused a significant increase after milking in TWT, TWA, and TCL, and in the corresponding increments of the same variables, compared with HM.

The recovery time for all tested variables to return to premilking conditions was  $>10$  h in all treatments assayed in the 3 experiments. We observed that teats included in MM batches and the reference removal methods showed no significant differences in any variable before milk removal. The recovery time of the variables after MM was not significantly different compared with that of the same variables after KS, CATH, and HM. However, we did observe an effect of removal method on the recovery pattern. Teat wall thickness was not decreased, compared with the value observed after milking, until 4 or 8 h after removal with CATH and KS, respectively. In experiment 3, the results obtained by MM were similar to those observed in the other experiments: TWT increased after milking (time = 0) and decreased in the remaining times after milking, although a different result was recorded for HM, where values continued to increase after milking for up to 2 h (Figure 1). Teat wall area, TEWA, and TCL had a similar pattern (data not shown).

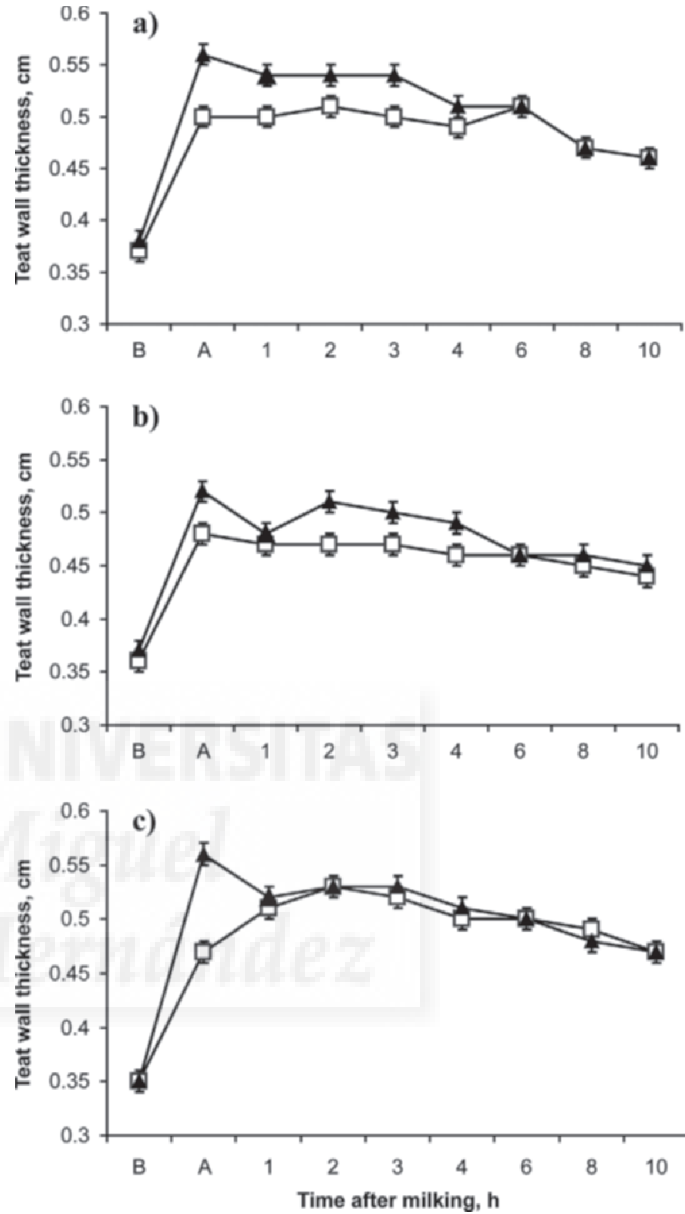
Milk removal by KS caused a smaller increase in TWT compared with MM. This result is in concordance with that reported in cows by Hamann and Mein (1988), where machine milking caused greater teat wall

**Table 1.** Effects of milk removal methods in teat wall thickness (TWT), teat wall area (TWA), teat end wall area (TEWA), and teat canal length (TCL) estimated by ultrasonography<sup>1</sup>

Item	Experiment 1			Experiment 2			Experiment 3		
	KS	MM	Significance	CATH	MM	Significance	HM	MM	Significance
Before removal									
TWT, cm	0.37 ± 0.01	0.38 ± 0.01	NS	0.36 ± 0.01	0.37 ± 0.01	NS	0.35 ± 0.01	0.35 ± 0.01	NS
TWA, cm <sup>2</sup>	0.79 ± 0.02	0.79 ± 0.02	NS	0.77 ± 0.02	0.75 ± 0.02	NS	0.76 ± 0.01	0.76 ± 0.01	NS
TEWA, cm <sup>2</sup>	0.59 ± 0.03	0.61 ± 0.03	NS	0.58 ± 0.03	0.54 ± 0.03	NS	0.58 ± 0.02	0.57 ± 0.02	NS
TCL, cm	0.61 ± 0.02	0.63 ± 0.02	NS	0.64 ± 0.02	0.61 ± 0.02	NS	0.63 ± 0.02	0.62 ± 0.02	NS
After removal									
TWT, cm	0.50 ± 0.01	0.56 ± 0.01	***	0.48 ± 0.02	0.52 ± 0.02	***	0.47 ± 0.01	0.55 ± 0.01	***
TWA, cm <sup>2</sup>	0.90 ± 0.02	0.99 ± 0.02	***	0.86 ± 0.02	0.92 ± 0.02	***	0.85 ± 0.02	0.96 ± 0.02	***
TEWA, cm <sup>2</sup>	0.77 ± 0.03	0.88 ± 0.03	***	0.72 ± 0.03	0.79 ± 0.03	*	0.67 ± 0.02	0.86 ± 0.02	***
TCL, cm	0.78 ± 0.02	0.81 ± 0.02	NS	0.77 ± 0.02	0.78 ± 0.0	NS	0.72 ± 0.02	0.83 ± 0.02	***
Increment, %									
TWT	39.41 ± 3.55	52.53 ± 3.55	**	36.83 ± 5.55	44.26 ± 5.55	NS	37.61 ± 4.37	60.50 ± 4.37	***
TWA	15.61 ± 2.18	26.05 ± 2.18	***	14.06 ± 2.66	23.61 ± 2.66	**	12.04 ± 2.03	26.97 ± 2.03	***
TEWA	36.98 ± 5.75	52.31 ± 5.75	*	34.91 ± 5.90	55.01 ± 5.90	**	20.72 ± 5.69	59.31 ± 5.69	***
TCL	32.23 ± 4.33	29.52 ± 4.33	NS	26.36 ± 4.56	32.71 ± 4.56	NS	15.99 ± 4.00	38.44 ± 4.00	***

<sup>1</sup>Values are means ± SEM; comparison of teat traits between kid suckling (KS) and machine milking (MM), between catheter removal (CATH) and MM, and between hand milking (HM) and MM.

\**P* < 0.05; \*\**P* < 0.01; \*\*\**P* < 0.001.



**Figure 1.** Recovery time of teat wall depends on milk removal method. (a) Experiment 1: kid suckling (□) versus machine milking (▲); (b) experiment 2: removal by catheter (□) versus machine milking (▲); (c) experiment 3: hand milking (□) versus machine milking (▲). B = before milking; A = after milking.

thickness values, measured by cutimeter, than did calf suckling. In the current work, we observed that TWA and TEWA were lower with KS compared with MM. Although there are no published works on the effect of KS, the greater increase in the variables with MM may be due to differences in the forces exerted on the teat and in the duration of teat end exposure to the vacuum, as occurs in cows.

Teat wall thickness and TWA values after MM were greater than those with CATH. Moreover, the incre-

ments of TWA and TEWA were greater with MM compared with CATH. Gleeson et al. (2002), in cows, also found a higher TWT with MM compared with catheter removal. Those authors also reported a greater TCL with MM; in the current work, we found no differences in TCL between MM and CATH. When milk is removed by catheter, no vacuum is applied and no compression force is exerted on the teat, so TWT after milk removal by CATH would not be expected to vary compared with the premilking value. Despite this, we observed that TWT did increase, as in KS, although to a lesser extent than with MM. This coincides with results in bovines by Gleeson et al. (2002), who explained that because no pressure was exerted on the teat during ultrasound scanning, the results could be influenced by intramammary pressure. In this sense, Gleeson et al. (2002) indicated that, in cattle, teat thickness after milk removal by CATH and by HM is lower than that after machine milking because the intramammary pressure is reduced and the liquids in the teat end are redistributed.

The lowest increments in TWA, TEWA, and TCL recorded were obtained by HM (Table 1). These results agree with those reported by Gleeson et al. (2002) in bovines. In hand milking, no vacuum is applied to the teat, although forces are exerted on the teat cistern to raise the intracisternal pressure and force the milk flow through the teat canal. The pressure exerted on the teat during hand milking depends on the patency of the teat canal (McDonald and Witzel, 1966). Although in the current experiment, the pressure exerted on the teat was not measured, we assumed that it was similar to that used in cattle or slightly higher (33.3 to 46.66 kPa; McDonald and Witzel, 1966). As this force depends on the hardness of the teat canal, the vacuum needed to open the teat canal in Murciano-Granadina goats is greater (35 kPa; J. R. Diaz, unpublished data) than that reported in bovines (17–20 kPa; Weiss et al., 2004). It is possible that because the teat is not subject to vacuum, the accumulation of liquids in the teat end may be less compared with that in MM or that the manual pressure applied to the teat tissues in HM may have been sufficient to assist in the re-evacuation of the accumulated liquids, which occurred in MM during the “D” phase of pulsation (milking phase).

The recovery time for TWT, TWA, TEWA, and TCL with all milk removal methods was greater than 10 h, which indicates that although MM caused greater increases in TWT and TWA immediately after milking, no differences were found in teat recovery time between machine milking and the methods of reference. Moreover, all variables were greater after milking than before with all tested methods and, although the variables did not reach premilking values at 10 h, most

variables reached lower values at 10 h than immediately after milking in KS, CATH, and MM, indicating a gradual recovery. Moreover, the values were recovered before the following milking, as we observed no day effect on the premilking values, no differences were found between the treatments before milking, and the values obtained were similar to those reported by Díaz et al. (2013) in the same breed.

Although no differences in recovery time were found in the different trials, a different recovery pattern was observed with HM. In general, the maximum values of the different ultrasound variables were obtained after milking in CATH, KS, and MM. These results agree with other published data in goats: Fahr et al. (2001) obtained the greatest increases in TWT and TCL immediately after machine milking compared with 1 h after milking. Ślószar et al. (2010) also found maximum values of TWT and TCL immediately after milking compared with 4 and 10 h after milking. On the other hand, Wójtowski et al. (2006) found the greatest values for TWT and TCL after 4 h of machine milking.

In all 3 experiments, the measured variables followed a similar pattern after MM. This indicates that the changes in teat tissues caused by properly performed MM are reversible and performance was similar to removal methods considered physiologic. The observed evolution of the teat after milking and the data obtained following removal by catheter (experiment 2) indicate that factors other than removal method, such as intramammary pressure, may influence changes in teat wall thickness.

## ACKNOWLEDGMENTS

The authors are grateful to Patrice Emery (ECM Technologies, Grenoble, France) for his collaboration and lending the ultrasound material used in this work. The study was supported by project AGL2006-06909 (Spanish Ministry of Education and Science and European Regional Development Fund, ERDF).

## REFERENCES

- Díaz, J. R., M. Alejandro, C. Peris, and N. Fernández. 2013. Use of ultrasound scanning to estimate teat wall thickness in Murciano-Granadina goats. *Livest. Sci.* 155:114–122.
- Fahr, R., J. Schulz, and F. Rosner. 2001. Milking associated changes of the teat end in goats (Melkbedingte Veränderungen an der Zitzenspitze der Ziege). *Tierarztl. Prax.* 29:151–156.
- Gleeson, D. E., E. J. O’Callaghan, and M. V. Rath. 2002. Effect of milking on bovine teat tissue as measured by ultrasonography. *Ir. Vet. J.* 55:628–632.
- Hamann, J., and G. A. Mein. 1988. Responses of bovine teat to machine milking: Measurement of changes in thickness of the teat apex. *J. Dairy Res.* 55:331–338.
- Hamann, J., and G. A. Mein. 1990. Measurement of machine-induced changes in thickness of the bovine teat. *J. Dairy Res.* 57:495–505.

- Hamann, J., and O. Osteras. 1994. Teat tissue reactions to machine milking and new infection risk. II: Special aspects. *Int. Dairy Fed. Bull.* 297:35–41.
- McDonald, J. S., and D. A. Witzel. 1966. Differential pressures across the bovine teat canal during three methods of milk removal. *J. Dairy Sci.* 49:176–178.
- Neijenhuis, F., G. H. Klungel, and H. Hogeveen. 2001. Recovery of cow teats after milking as determined by ultrasonography scanning. *J. Dairy Sci.* 84:2599–2606.
- Paulrud, C. O., S. Clausen, P. E. Andersen, and M. D. Rasmussen. 2005. Infrared thermography and ultrasonography to indirectly monitor the influence of liner type and overmilking on teat tissue recovery. *Acta Vet. Scand.* 46:137–147.
- Ślósarz, P., J. Wójtowski, S. Bielińska, A. Frąckowiak, A. Ludwiczak, J. Krzyzewski, E. Bagnicka, and N. Strzałkowska. 2010. Machine-induced changes of caprine teats diagnosed by ultrasonography. *Afr. J. Biotechnol.* 9:8698–8703.
- Spanu, C., D. J. Reinemann, H. Momont, N. Cook, P. L. Ruegg, and R. D. Bade. 2008. Ultrasonic assessment of teat tissue congestion. Pages 1893–1899 in *Proc. 2008 ASABE Annual International Meeting*, Providence, Rhode Island. Am. Soc. Agric. Biol. Eng., St. Joseph, MI.
- Weiss, D., M. Weinfurter, and R. M. Bruckmaier. 2004. Teat anatomy and its relationship with quarter and udder milk flow characteristics in dairy cows. *J. Dairy Sci.* 87:3280–3289.
- Wójtowski, J., P. Ślósarz, S. Bielińska, S. Nowicki, A. Gut, and R. Danków. 2006. Ultrasound image of morphological changes of teat end in sheep caused by machine milking. *Arch. Tierzucht.* 49(Special Issue):231–237.





**4.5. How does the milk removal method affect teat tissue and teat recovery in dairy ewes?**

Alejandro, M., Roca, A., Romero, G. y Diaz, J.R.,

Journal of Dairy Research, 2014 - 81: 350-357

DOI: <http://dx.doi.org/10.1017/S0022029914000338>



## How does the milk removal method affect teat tissue and teat recovery in dairy ewes?

Manuel Alejandro, Amparo Roca, Gema Romero and Jose Ramon Díaz\*

Departamento de Tecnología Agroalimentaria, Escuela Politécnica Superior de Orihuela, Universidad Miguel Hernández, Ctra. Beniel, Km. 3,2. 03312 Orihuela, Alicante, Spain

Received 14 January 2014; accepted for publication 29 April 2014; first published online 10 June 2014

The aim of this work was to study how machine milking (MM) carried out in suitable conditions affects teat wall thickness and teat canal length and their return after milking to pre-milking conditions, in comparison with other milk extraction methods considered biological referents: lamb suckling (LS), milk removal by catheter (RC) and hand milking (HM). Three Latin square experiments were designed, using 11 ewes in the first experiment (LS), 13 in the second (RC) and 12 in the third (HM). Each of the Latin squares was divided into two periods: in the first, the left gland of each animal was machine milked and the corresponding treatment (LS, RC and HM) was applied to the right gland. Subsequently, in the second period the extraction methods were interchanged. During the experimental period, 4 sampling days were carried out (2 in each experimental period), where ultrasound scans were taken before (B) and immediately after milking (A) and at 1 (1 h), 2 (2 h), 3 (3 h), 4 (4 h), 6 (6 h), 8 (8 h) and 10 (10 h) hours after milking finished. Teat wall thickness (TWT), teat wall area (TWA), teat end area (TEWA) and teat canal length (TCL) were measured in all the ultrasound images. MM increased TWT after milking compared with RC. TWT, TWA, TEWA and TCL were lower ( $P < 0.05$ ) in HM than in MM. No significant differences ( $P > 0.05$ ) were found between LS and MM for any variable. The extraction method affected the recovery time of the variables, with total teat recovery at 6 h after RC and 4 h after HM. In the case of LS, the TEWA and TCL values were recovered sooner, as of 3 h. Teat recovery time after MM was similar to the extraction method with which it was compared in each experiment. Thus, considering the similar increase in wall thickness and their recovery time compared with the reference methods, it was concluded that machine milking, carried out in optimum conditions and respecting the time interval between milkings usually applied on sheep farms (8–12 h), would not affect teat integrity. Moreover, given the variability observed in teat thickness recovery time between the different experiments, further research should be carried out to study which factors intrinsic and extrinsic to the animal may affect the teat wall thickness and recovery time after machine milking.

**Keywords:** Recovery teat, ewe, congestion, ultrasonography, machine milking.

Calf suckling, milk extraction by catheter and hand milking are considered physiological methods of reference in cattle to assess physiological alterations of the teat caused by machine milking (Hamann & Burvenich, 1994) as these methods either cause no changes in teat tissues or any such changes are minimal (Gleeson et al. 2002), and the teat wall thickness when measured by cutimeter may even be diminished (Hamann & Mein, 1988).

In cattle, suckling, milk removal by catheter and hand milking give rise to lower teat tissue thickness values than

machine milking (Hamann & Mein, 1990; Gleeson et al. 2002), as also occurs in dairy goats (Alejandro et al. 2014a). These differences are attributed to the conditions in which the milk is extracted by each method. In machine milking, during the massage phase the liner collapses on the teat end, generating a compressive force that closes the teat canal, stopping milk flow and re-evacuating the liquid accumulated in the teat end. Despite this, the teat end is still exposed to milking vacuum (van der Tol et al. 2010) which does not occur during offspring suckling. During suckling, only the teat end is exposed to a high vacuum, as the rest of the teat is protected and supported by the tongue and palate (van der Tol et al. 2010). In milk extraction by catheter

\*For correspondence; e-mail: jr.diaz@umh.es



and hand milking, no vacuum is applied to the teat; in the former case, the milk drains from the udder owing to the difference between glandular and atmospheric pressure (Hamann & Mein, 1988) and in manual milking the milk is forced through the teat canal by high intracisternal pressure that builds up when the teat is compressed by hand. The amount of pressure built up within the teat sinus is highly variable and depends on the force applied by hand and the patency of the teat canal (McDonald & Witzel, 1966).

After conventional mechanical milking, the teat needs some hours to recover its pre-milking status and during this period the penetrability of microorganisms into the teat channel may increase, thus exacerbating the risk of new intramammary infections (Hamann & Osteras, 1994). In practical situations, teat tissue changes are the most suitable method to estimate teat canal penetrability (Neijenhuis et al. 2001). Hamann & Mein (1990) noted that TWT measured by cutimeter returns to pre-milking values after 15 min in calf suckling and in less than 1 h in manual milking, although this time is prolonged up to 4 h in teats milked with modified milking equipment (pulsation only at the teat base and pulse chamber pressure 35 kPa over atmospheric pressure). In bovine cattle, TWT gauged by ultrasound is recovered at around 4 h after milking (Neijenhuis et al. 2001; Gleeson et al. 2002) whereas the teat canal and teat end thickness need more than 8 h (Neijenhuis et al. 2001). In goats, the recovery time is greater than 10 h, both in machine milking (MM) and in other reference methods (Alejandro et al. 2014a). In sheep, recovery time after MM may exceed 10 h (Wójtowski et al. 2006).

Owing to the limited information available on the effect of different milk extraction systems on teat status and recovery time in Manchega ewes, the aim of this work was to study how MM affects teat wall thickness and teat canal length and their recovery after milking in normal physiological conditions, compared with other milk extraction methods considered referents: lamb suckling (LS), milk removal by catheter (RC) and hand milking (HM).

## Materials and methods

### *Farm and animal management*

The experiment was carried out at the Small Ruminant Educational and Research farm at the Escuela Politécnica Superior de Orihuela at the Miguel Hernández University, (Orihuela, Spain). The farm flock consisted of 80 Manchega breed ewes. The milking parlour was 'Casse' type with quit exit stall, a platform with 12 places and 12 low-line milking units (1×12×12). Teatcups had an automatic vacuum cut-off valve and silicone liners (Top Flow S) (Gea Farm Technologies, Bönen, Germany). The milking parameters used in the experiment were 36 kPa vacuum level, 180 pulsation/min and 50% pulsation ratio.

### *Experimental design*

To achieve the objectives, three experiments in Latin square design were carried out.

*Experiment 1 (EXP 1): lamb suckling (LS) vs. mechanical milking (MM).* Eleven ewes were used (weeks 3 and 4 post partum). One day before the pre-experimental period began (5 d duration) the lambs were separated from the ewes into adjacent housing and then reunited with their mothers in the mornings for suckling from the 2 glands during the pre-experimental period and from one of the 2 glands during the experimental period. During the experimental period, when the gland was emptied the lambs were separated into the adjacent housing again, where they were given the milk extracted from the ewe's other gland using buckets with teats. Lambs had free access to alfalfa hay and water.

The experimental phase began on the 6th day and lasted for 14 d. In the first experimental period (7 d), the left gland of each ewe was machine milked while in the right gland the milk was extracted by the suckling lambs. In the second experimental period (remaining 7 d) the gland group treatments (left and right) were interchanged.

*Experiment 2 (EXP 2): milk removal by catheter (RC) vs. mechanical milking (MM).* Fifteen ewes were used (weeks 6 and 7 post partum). The pre-experimental stage lasted for 2 d, where extraction of milk from both glands was performed by catheter. During this period, two animals suffered intramammary infection and were removed from the experiment. We also decided to shorten the experimental period to 4 d to reduce the risk of new intramammary infections. In the first experimental period (2 d), the left gland of each ewe was machine milked, whereas milk was extracted from the right gland by force of gravity and catheter. In the second experimental period (remaining 2 d) the gland group treatments (left and right) were interchanged.

For milk extraction from the glands by catheter, the procedure was as follows: first, the teat was cleaned with cotton wool dipped in 70% alcohol. Before introducing the catheter, a more thorough cleansing of the teat tip and sphincter was performed. To lower the risk of infection in the gland, the first streams of foremilk was discarded while the catheter was inserted. To remove the catheter once the milk was extracted, a piece of cotton wool dipped in 70% alcohol was placed over the teat sphincter. The catheter was washed, disinfected and submerged in 70% alcohol before being used again.

*Experiment 3 (EXP 3): hand milking (HM) vs. mechanical milking (MM).* Twelve ewes were used (weeks 4 and 5 post partum). The pre-experimental stage lasted for 2 d and milk extraction from both glands was performed by hand. The experimental phase began on the 3rd day and lasted for 4 d. In the first experimental period (2 d), the left glands of all

ewes were machine milked while the right glands were hand milked. In the second experimental period (remaining 2 d) the gland group treatments (left and right) were interchanged.

#### *Variables measured on sampling days*

During the pre-experimental period, samples were taken on 2 d in EXP1 and on 1 d in EXP2 and EXP3, taking ultrasound scans of the teats before (B) and after (A) milking. During the experimental period, in total there were 4 sampling days: two controls on the 2 d prior to treatment switchover and two controls on the last 2 d of the experiment. In these controls, ultrasound explorations were performed before milking (B), after milking (A) and at 1 (1 h), 2 (2 h), 3 (3 h), 4 (4 h), 6 (6 h), 8 (8 h) and 10 (10 h) hours after milking was completed.

Ultrasound scanning was performed by the methodology described by Alejandro et al. (2014b) in sheep. A portable ultrasound unit (AgrosScan AL, ECM, Noveko International Inc., France) was used, equipped with a 5-MHz linear probe. For the examination, a transparent plastic recipient filled with water at 37 °C was used. The probe was placed inside a latex bag filled with contact gel and contact gel was applied between the latex bag and the recipient. The images obtained were processed using a software program designed for the purpose by the research team (ECOTEAT<sup>®</sup>) and the following measurements were studied: teat wall thickness (TWT, mean value of the two walls examined, cm), area of the teat walls (TWA, cm<sup>2</sup>), teat end area (TEWA, cm<sup>2</sup>) and teat canal length (TCL, cm). Although the teat canal was not appreciable in many of the ultrasound images, the ECOTEAT<sup>®</sup> program was able to estimate TCL by measuring the distance from the teat tip to the end of the teat cistern (outer and inner end of the teat canal, respectively). Thickness increment values were obtained by means of the following formula: Increment (%):  $100 \times (\text{after milking} - \text{before milking}) / \text{before milking}$ .

On each sampling day, milk production and extraction time per gland were recorded. For HM and RC the milk collected was weighed on a scale; for LS the lambs were weighed before and after suckling. For MM, production was recorded on the electronic production meters installed in the milking parlour.

#### *Statistical analysis*

The association between the explanatory variables and teat tissue variables was assessed using a linear mixed model procedure (Proc Mixed, SAS Institute Inc, V.9.1. 2002). Outcome variables were TWT, TWA, TEWA and TCL measured before and after milking and their increments. For each experiment (1, 2, 3) the following explanatory variables were included as fixed effects: treatment (TRT, 2 levels, 1: LS, RC or HM, for experiment 1,2, and 3 respectively; 2: MM); Period (PER, 2 levels, 1: first period and 2: second period); Day nested within PER (PDAY, 2 levels, 1: first day; 2: second day); Interaction of PER × TRT

was confounded with gland within ewe and consequently not included. Ewe and Gland (2 levels, R: right; L: left) nested to Ewe were considered as random terms.

A similar modelling procedure was used to assess teat recovery in each of the treatments assayed in each experiment. As a result, the final model included TWT, TWA, TEWA and TCL as the outcome variables and the following explanatory variables: Moment (M, 9 levels, B: before, A: after, 1, 2, 3, 4, 6, 8, 10 h after milking); Period (PER, 2 levels, 1: first period and 2: second period); Day nested to PER (PDAY, 2 levels, 1: first day; 2: second day). Ewe and Gland (2 levels, R: right; L: left) nested to Ewe were considered as random terms.

Milk production and milking time were not included as covariables in the final model, as there was no significant effect.

## **Results**

At the start of the experiments, the total milk production from the animals at morning milking was  $841 \pm 127$  ml in EXP1,  $573 \pm 88$  ml in EXP2 and  $638 \pm 99$  ml in EXP3. During the pre-experimental periods of the three experiments, no significant differences ( $P < 0.05$ ) were found between the left and right glands in any variable, either before or after milking (data not shown). Means of TWT in the pre-experimental period varied from 0.38 to 0.45 cm and from 0.46 to 0.55 cm before and after milking, respectively. TWA average varied from 1.33 to 1.50 cm<sup>2</sup> and 1.43 to 1.58 cm<sup>2</sup> before and after milking, respectively, and TEWA means varied from 0.89 to 1.21 cm<sup>2</sup> and from 1.07 to 1.22 cm<sup>2</sup> before and after milking, respectively. Finally, the average of TCL varied from 0.84 to 1.06 cm and from 1.00 to 1.12 cm before and after milking, respectively.

#### *Effect of milk extraction method on teat wall thickness and teat canal length*

Table 1 shows the value of the variables taken by ultrasound (TWT, TWA, TEWA and TCL) before and after milking and their increments in each of the experiments. In EXP1 (LS), no significant differences were found between LS and MM in any of the variables taken by ultrasound before and after milk extraction, nor in the calculated increase in the variables.

MM caused a rise in TWT ( $P < 0.01$ ) compared with RC (EXP 2), although there were no significant differences in any variable when comparing the increase between treatments.

After milk extraction, it was observed that in mechanically milked glands the TWT, TWA, TEWA and TCL variables were significantly higher than in manually milked glands (EXP3). However, these differences were not observed in the increments calculated.

The variations in TWT, TWA, TEWA and TCL in EXP1 and EXP3 after machine milking were similar, whereas in EXP2 the variation of the variables was slightly higher. The TWT increment in the three milk extraction methods of reference

**Table 1.** Effects of milk removal methods on teat wall thickness and teat canal length variables measured by ultrasonography†

	Lamb suckling	Machine milking	L.S.#	Removal by catheter	Machine milking	L.S.	Hand milking	Machine milking	L.S.
<i>Before extraction</i>									
Teat wall thickness (TWT), cm	0.38±0.02	0.37±0.02	NS	0.46±0.02	0.48±0.02	NS	0.45±0.02	0.47±0.02	NS
Teat wall area (TWA), cm <sup>2</sup>	1.32±0.05	1.29±0.05	NS	1.43±0.04	1.46±0.04	NS	1.50±0.04	1.50±0.04	NS
Teat-end area (TEWA), cm <sup>2</sup>	0.91±0.06	0.87±0.06	NS	1.03±0.05	0.98±0.05	NS	1.17±0.06	1.18±0.06	NS
Teat canal length (TCL), cm	0.88±0.03	0.86±0.03	NS	0.92±0.03	0.97±0.03	NS	1.04±0.04	1.06±0.04	NS
<i>After extraction</i>									
Teat wall thickness (TWT), cm	0.49±0.02	0.50±0.02	NS	0.54±0.02	0.58±0.02	**	0.54±0.02	0.57±0.02	*
Teat wall area (TWA), cm <sup>2</sup>	1.46±0.06	1.50±0.06	NS	1.54±0.03	1.56±0.03	NS	1.55±0.05	1.62±0.05	***
Teat-end area (TEWA), cm <sup>2</sup>	1.09±0.08	1.12±0.08	NS	1.20±0.05	1.25±0.05	NS	1.17±0.06	1.31±0.06	**
Teat canal length (TCL), cm	1.02±0.03	1.05±0.03	NS	1.10±0.03	1.15±0.03	NS	1.07±0.03	1.14±0.03	**
<i>Increment (%)</i>									
Teat wall thickness (TWT)	37.43±8.83	38.95±8.83	NS	21.67±4.40	22.56±4.40	NS	24.66±5.85	26.78±5.85	NS
Teat wall area (TWA)	12.64±3.98	17.83±3.98	NS	8.26±2.10	7.83±2.10	NS	4.70±2.37	8.76±2.37	NS
Teat-end area (TEWA)	23.99±6.91	35.57±6.91	NS	29.53±6.01	26.54±6.01	NS	3.53±4.08	13.54±4.08	NS
Teat canal length (TCL)	19.82±4.22	25.03±4.22	NS	23.64±4.22	19.77±4.22	NS	5.42±2.56	8.45±2.56	NS

†Values are means±SEM.

#L.S.: Significance level.

\* $P < 0.05$ ; \*\* $P < 0.01$ ; \*\*\* $P < 0.001$ .

(LS, RC and HM) was similar, although the increment of TWA, TEWA and TCL was lower in manually milked glands.

#### Effect of milk extraction method on teat recovery

The time taken for TWT, TWA, TEWA and TCL to recover their pre-milking values varied according to the milk extraction method (Tables 2–4). TWT was recovered at 6 h and 4 h in EXP2 and EXP3, respectively. However, recovery time in EXP1 was more than 10 h.

TWA was recovered at 4 and 2 h with RC (EXP2) and HM (EXP3), although in LS (EXP1) recovery time was more than 10 h. TEWA and TCL recovery times were 3 h (EXP1) and 4 h (EXP2), whereas in EXP3 (HM) the values were similar before and after milk extraction, so recovery was immediate.

TWT and TWA recovery time after mechanical milking was very similar to that observed after the respective reference method in each experiment (Fig. 1). However, TEWA was recovered at 10 h in EXP1, at 6 h in EXP2 and at 2 h in EXP3. In the case of TCL, it was recovered at 8 h in EXP1 and at 2 h in EXP2 and EXP3.

In all variables and all extraction methods, the greatest value was obtained after machine milking. TWT began to decrease at 1 h in EXP1 and at 2 h in EXP2 and EXP3. TWA decreased as of 1 h in EXP1 and at 2 h in EXP 2. TEWA and TCL decreased as of 1 h in EXP1 and EXP2. In EXP3, TWA decreased at 1 h, whereas TEWA and TCL values did not change after milk extraction.

#### Discussion

The changes in the TWT, TWA and TCL were similar between milk extraction by lamb suckling and machine milking. In cattle, Hamann & Mein (1988) report that calf suckling gives rise to lower teat thickness values than mechanical milking when the measurements are taken by cutimeter. However, cows were milked with a higher teat end vacuum than in the present experiment. Alejandro et al. (2014a) in goats, found lower increments of TWT, TWA and TEWA in kid suckling than in machine milking.

Knizkova et al. (2005) noted that the degree of stress suffered by the teat during suckling depends on the age of the offspring and the suckling time. These authors found that calf suckling caused a greater increase in average teat temperature during milk period (20 d postpartum) compared with the colostrum period (5 d), weaning period (16 d) and mechanical milking (42.6 kPa). In the present work, no effect of the lambs' age was observed, as during experimental period 2 the lambs were 7 d older than in period 1, but the PER×TRT interaction had no significant effect on the variables. Although high vacuum levels are generated around the teat end in calf suckling (61 kPa, Rasmussen & Mayntz, 1998), the teat end is only exposed to vacuum for half of the time it is during mechanical milking, as when the calf swallows the milk the vacuum drops to values close to zero (Rasmussen & Mayntz, 1998).

**Table 2.** Mean values of teat wall thickness, areas and canal length variables measured before and after milking at different hourly intervals in Experiment 1 [lamb suckling (LS) vs. mechanical milking (MM)]

Treatment	Variablest	Time‡								
		Before	After	1 h	2 h	3 h	4 h	6 h	8 h	10 h
LS	TWT	0.38 <sup>a</sup> ±0.01	0.49 <sup>b</sup> ±0.01	0.49 <sup>bc</sup> ±0.01	0.46 <sup>cd</sup> ±0.01	0.47 <sup>bcd</sup> ±0.01	0.48 <sup>bcd</sup> ±0.01	0.46 <sup>d</sup> ±0.01	0.46 <sup>d</sup> ±0.01	0.46 <sup>d</sup> ±0.01
	TWA	1.32 <sup>a</sup> ±0.04	1.46 <sup>b</sup> ±0.04	1.45 <sup>bc</sup> ±0.04	1.41 <sup>cd</sup> ±0.04	1.41 <sup>cd</sup> ±0.04	1.42 <sup>cd</sup> ±0.04	1.40 <sup>d</sup> ±0.04	1.38 <sup>d</sup> ±0.04	1.39 <sup>d</sup> ±0.04
	TEWA	0.91 <sup>a</sup> ±0.05	1.09 <sup>b</sup> ±0.05	1.02 <sup>bc</sup> ±0.05	0.99 <sup>cd</sup> ±0.05	0.96 <sup>acd</sup> ±0.05	0.98 <sup>acd</sup> ±0.05	0.96 <sup>acd</sup> ±0.05	0.92 <sup>ad</sup> ±0.05	0.90 <sup>a</sup> ±0.05
	TCL	0.88 <sup>a</sup> ±0.03	1.03 <sup>b</sup> ±0.03	0.98 <sup>bc</sup> ±0.03	0.97 <sup>cd</sup> ±0.03	0.93 <sup>ade</sup> ±0.03	0.95 <sup>cde</sup> ±0.03	0.92 <sup>ade</sup> ±0.03	0.90 <sup>ae</sup> ±0.03	0.88 <sup>a</sup> ±0.03
MM	TWT	0.37 <sup>a</sup> ±0.01	0.50 <sup>b</sup> ±0.01	0.46 <sup>c</sup> ±0.01	0.45 <sup>c</sup> ±0.01	0.45 <sup>cd</sup> ±0.01	0.45 <sup>cd</sup> ±0.01	0.44 <sup>cd</sup> ±0.01	0.42 <sup>d</sup> ±0.01	0.43 <sup>d</sup> ±0.01
	TWA	1.29 <sup>a</sup> ±0.04	1.50 <sup>b</sup> ±0.04	1.43 <sup>c</sup> ±0.04	1.43 <sup>c</sup> ±0.04	1.41 <sup>c</sup> ±0.04	1.42 <sup>c</sup> ±0.04	1.41 <sup>c</sup> ±0.04	1.38 <sup>cd</sup> ±0.04	1.36 <sup>d</sup> ±0.04
	TEWA	0.87 <sup>a</sup> ±0.05	1.11 <sup>b</sup> ±0.05	1.01 <sup>c</sup> ±0.05	1.01 <sup>c</sup> ±0.05	1.01 <sup>c</sup> ±0.05	1.00 <sup>cd</sup> ±0.05	0.97 <sup>cd</sup> ±0.05	0.93 <sup>cd</sup> ±0.05	0.89 <sup>a</sup> ±0.05
	TCL	0.86 <sup>a</sup> ±0.03	1.04 <sup>b</sup> ±0.03	0.96 <sup>c</sup> ±0.03	0.96 <sup>c</sup> ±0.03	0.97 <sup>c</sup> ±0.03	0.95 <sup>c</sup> ±0.03	0.92 <sup>cd</sup> ±0.03	0.88 <sup>ad</sup> ±0.03	0.87 <sup>ad</sup> ±0.03

†TWT, teat wall thickness (cm); TWA, teat wall area (cm<sup>2</sup>); TEWA, teat-end area (cm<sup>2</sup>); TCL, teat canal length (cm).

‡Before: before milking. After: after milking; 1 to 10 h after milking.

<sup>a-c</sup>Means without a common letter within a row indicate significant differences at  $P < 0.05$ .

**Table 3.** Mean values of teat wall thickness, areas and canal length variables measured before and after milking at different hourly intervals in Experiment 2 [milk removal by catheter (RC) vs. mechanical milking (MM)]

Treatment	Variablest	Time‡								
		Before	After	1 h	2 h	3 h	4 h	6 h	8 h	10 h
RC	TWT	0.46 <sup>a</sup> ±0.01	0.54 <sup>b</sup> ±0.01	0.54 <sup>b</sup> ±0.01	0.52 <sup>bc</sup> ±0.01	0.50 <sup>cd</sup> ±0.01	0.49 <sup>de</sup> ±0.01	0.46 <sup>a</sup> ±0.01	0.47 <sup>ae</sup> ±0.01	0.48 <sup>ae</sup> ±0.01
	TWA	1.44 <sup>a</sup> ±0.03	1.54 <sup>b</sup> ±0.03	1.52 <sup>bc</sup> ±0.03	1.51 <sup>bcd</sup> ±0.03	1.48 <sup>cde</sup> ±0.03	1.46 <sup>ae</sup> ±0.03	1.45 <sup>ae</sup> ±0.03	1.45 <sup>ae</sup> ±0.03	1.47 <sup>ade</sup> ±0.03
	TEWA	0.98 <sup>a</sup> ±0.05	1.20 <sup>b</sup> ±0.05	1.16 <sup>b</sup> ±0.05	1.08 <sup>c</sup> ±0.05	1.06 <sup>c</sup> ±0.05	1.01 <sup>ac</sup> ±0.05	1.06 <sup>ac</sup> ±0.05	1.03 <sup>ac</sup> ±0.05	1.07 <sup>c</sup> ±0.05
	TCL	0.92 <sup>a</sup> ±0.03	1.10 <sup>b</sup> ±0.03	1.07 <sup>b</sup> ±0.03	0.99 <sup>c</sup> ±0.03	0.98 <sup>c</sup> ±0.03	0.94 <sup>ac</sup> ±0.03	0.99 <sup>c</sup> ±0.03	0.96 <sup>ac</sup> ±0.03	0.98 <sup>c</sup> ±0.03
MM	TWT	0.49 <sup>a</sup> ±0.01	0.58 <sup>b</sup> ±0.01	0.56 <sup>bc</sup> ±0.01	0.55 <sup>cd</sup> ±0.01	0.51 <sup>ef</sup> ±0.01	0.53 <sup>de</sup> ±0.01	0.49 <sup>af</sup> ±0.01	0.49 <sup>af</sup> ±0.01	0.50 <sup>af</sup> ±0.01
	TWA	1.46 <sup>a</sup> ±0.03	1.56 <sup>b</sup> ±0.03	1.56 <sup>b</sup> ±0.03	1.54 <sup>bc</sup> ±0.03	1.52 <sup>cd</sup> ±0.03	1.52 <sup>bcd</sup> ±0.03	1.49 <sup>ad</sup> ±0.03	1.49 <sup>ad</sup> ±0.03	1.50 <sup>ad</sup> ±0.03
	TEWA	1.03 <sup>a</sup> ±0.05	1.25 <sup>b</sup> ±0.05	1.21 <sup>bc</sup> ±0.05	1.13 <sup>d</sup> ±0.05	1.14 <sup>cd</sup> ±0.05	1.12 <sup>d</sup> ±0.05	1.11 <sup>ad</sup> ±0.05	1.10 <sup>ad</sup> ±0.05	1.12 <sup>d</sup> ±0.05
	TCL	0.98 <sup>a</sup> ±0.03	1.15 <sup>b</sup> ±0.03	1.10 <sup>b</sup> ±0.03	1.03 <sup>ac</sup> ±0.03	1.04 <sup>c</sup> ±0.03	1.03 <sup>ac</sup> ±0.03	1.03 <sup>ac</sup> ±0.03	1.01 <sup>ac</sup> ±0.03	1.02 <sup>ac</sup> ±0.03

†TWT, teat wall thickness (cm); TWA, teat wall area (cm<sup>2</sup>); TEWA, teat-end area (cm<sup>2</sup>); TCL, teat canal length (cm).

‡Before: before milking. After: after milking; 1 to 10 h after milking.

<sup>a-e</sup>Means without a common letter within a row indicate significant differences at  $P < 0.05$ .

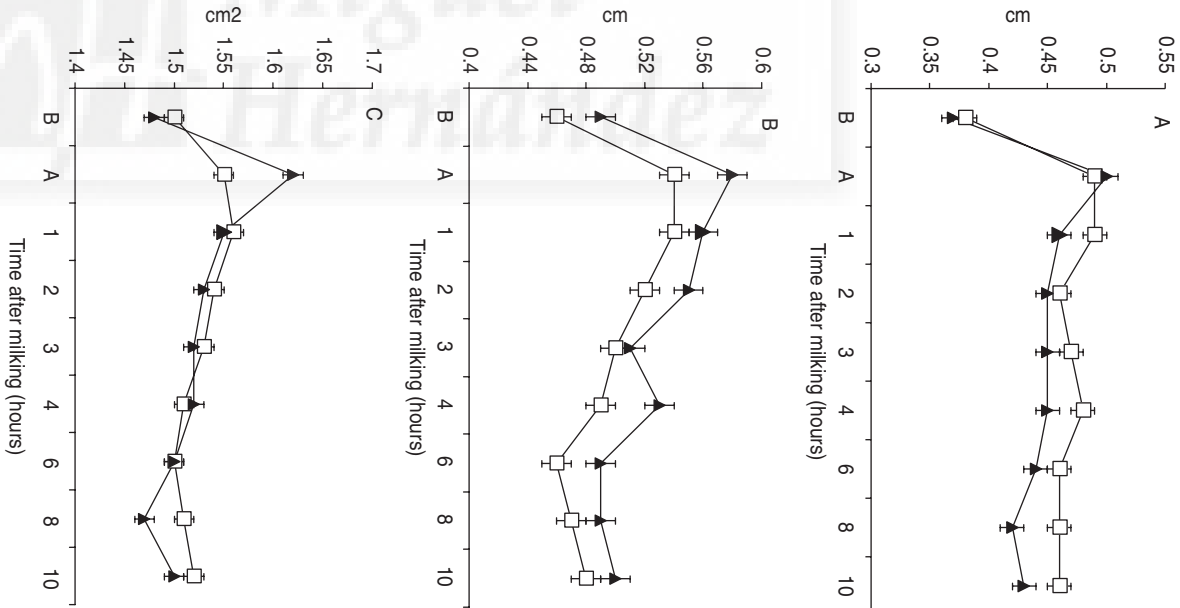
**Table 4.** Mean values of teat wall thickness, areas and canal length variables measured before and after milking at different hourly intervals in Experiment 3 [hand milking (HM) vs. mechanical milking (MM)]

Treatment	Variablest	Time†								
		Before	After	1 h	2 h	3 h	4 h	6 h	8 h	10 h
HM	TWT	0.46 <sup>a</sup> ± 0.02	0.55 <sup>b</sup> ± 0.02	0.53 <sup>b</sup> ± 0.02	0.53 <sup>b</sup> ± 0.02	0.49 <sup>c</sup> ± 0.02	0.47 <sup>ac</sup> ± 0.02	0.47 <sup>ac</sup> ± 0.02	0.46 <sup>a</sup> ± 0.02	0.47 <sup>ac</sup> ± 0.02
	TWA	1.50 <sup>ac</sup> ± 0.03	1.55 <sup>b</sup> ± 0.03	1.56 <sup>b</sup> ± 0.03	1.54 <sup>ab</sup> ± 0.03	1.53 <sup>abc</sup> ± 0.03	1.51 <sup>ac</sup> ± 0.03	1.50 <sup>c</sup> ± 0.03	1.51 <sup>ac</sup> ± 0.03	1.52 <sup>abc</sup> ± 0.03
	TEWA	1.17 <sup>ab</sup> ± 0.05	1.17 <sup>ab</sup> ± 0.05	1.21 <sup>b</sup> ± 0.05	1.17 <sup>ab</sup> ± 0.05	1.15 <sup>ab</sup> ± 0.05	1.14 <sup>a</sup> ± 0.05	1.15 <sup>ab</sup> ± 0.05	1.16 <sup>ab</sup> ± 0.05	1.21 <sup>b</sup> ± 0.05
	TCL	1.05 <sup>abc</sup> ± 0.03	1.07 <sup>ab</sup> ± 0.03	1.09 <sup>b</sup> ± 0.03	1.06 <sup>abc</sup> ± 0.03	1.03 <sup>ac</sup> ± 0.03	1.02 <sup>c</sup> ± 0.03	1.03 <sup>ac</sup> ± 0.03	1.04 <sup>ac</sup> ± 0.03	1.07 <sup>ab</sup> ± 0.03
MM	TWT	0.45 <sup>af</sup> ± 0.02	0.56 <sup>b</sup> ± 0.02	0.51 <sup>c</sup> ± 0.02	0.50 <sup>cd</sup> ± 0.02	0.49 <sup>de</sup> ± 0.02	0.47 <sup>ae</sup> ± 0.02	0.45 <sup>af</sup> ± 0.02	0.43 <sup>f</sup> ± 0.02	0.45 <sup>af</sup> ± 0.02
	TWA	1.48 <sup>ac</sup> ± 0.03	1.62 <sup>b</sup> ± 0.03	1.55 <sup>c</sup> ± 0.03	1.53 <sup>cd</sup> ± 0.03	1.52 <sup>cde</sup> ± 0.03	1.52 <sup>cde</sup> ± 0.03	1.50 <sup>ade</sup> ± 0.03	1.47 <sup>a</sup> ± 0.03	1.50 <sup>ade</sup> ± 0.03
	TEWA	1.16 <sup>a</sup> ± 0.05	1.33 <sup>b</sup> ± 0.05	1.24 <sup>c</sup> ± 0.05	1.20 <sup>ac</sup> ± 0.05	1.17 <sup>ac</sup> ± 0.05	1.19 <sup>ac</sup> ± 0.05	1.18 <sup>ac</sup> ± 0.05	1.16 <sup>a</sup> ± 0.05	1.21 <sup>ac</sup> ± 0.05
	TCL	1.05 <sup>ad</sup> ± 0.03	1.15 <sup>b</sup> ± 0.03	1.11 <sup>bc</sup> ± 0.03	1.08 <sup>ac</sup> ± 0.03	1.05 <sup>ad</sup> ± 0.03	1.04 <sup>ad</sup> ± 0.03	1.06 <sup>ad</sup> ± 0.03	1.03 <sup>d</sup> ± 0.03	1.06 <sup>acd</sup> ± 0.03

†TWT, teat wall thickness (cm); TWA, teat wall area (cm<sup>2</sup>); TEWA, teat-end area (cm<sup>2</sup>); TCL, teat canal length (cm).

‡Before: before milking. After: after milking; 1 to 10 h after milking.

<sup>a-e</sup>Means without a common letter within a row indicate significant differences at  $P < 0.05$ .



**Fig. 1.** Recovery time of teat wall thickness (A: Experiment 1, □ kid sucking; ▲ machine milking; B: Experiment 2, □ removal by catheter; ▲ machine milking) and teat wall area (C: Experiment 3, □ hand milking; ▲ machine milking) depends on milk removal method (before milking: B; after milking: A).

MM caused a significant increase in TWT compared with RC, whereas the remaining variables (TWA, TEWA and TCL) were not affected by the extraction method. In goats, Alejandro et al. (2014a) report that mechanically milked glands have higher TWT and TWA values compared with milk extraction by catheter, while Gleeson et al. (2002), in the bovine, note that milk extraction by catheter led to lower TWT and TCL values than machine milking.

In milk extraction by catheter, the only milk obtained is in the udder cistern and no compression force is exerted on the udder, so it was to be expected that the variables measured would not change after milking. Nevertheless, we observed



that TWT increased compared with the pre-milking values, as was observed in bovine cattle (Gleeson et al. 2002) and goats (Alejandro et al. 2014a), so it seems reasonable to suppose that there are additional factors, other than milk extraction, which affect in teat tissue variation. When milk is extracted from the cistern by catheter, the intramammary pressure is decreased (Hamann & Mein, 1990), lowering the pressure on the mammary gland wall muscles (Lefcourt, 1982) and reducing stretching of the teat cistern walls, leading to an increase in TWT values. However, Hamann & Mein (1990) in bovine observed that RC caused a reduction of 3% in teat thickness, gauged by cutimeter. According to these authors, intramammary pressure does not affect measurements taken by cutimeter because the spring pressure of the device is higher than the internal blood pressure. On the other hand, with ultrasound no pressure is applied to the teat, so intramammary pressure could affect the TWT measurements (Alejandro et al. 2014a). These authors found an increase in TWT, TWA and TEWA following RC extraction in goats.

MM increased the TWT, TWA, TEWA and TCL values compared with hand milking. In goats (Alejandro et al. 2014a) and cows (Gleeson et al. 2002), hand milking leads to lower TWT values, possibly due to the different pressures applied to the teat or due to the manual teat stimulation during hand milking, may have activated some local regulatory mechanism in the udder (Svennersten et al. 1990). The force applied by the operator to raise the pressure and force intracisternal milk flow through the teat canal and extract the milk manually depends on the teat canal patency (McDonald & Witzel, 1966), and in this sense the vacuum needed to open the teat canal in Manchega ewes is much lower (17 kPa) than in goats (35 kPa, Díaz et al. unpublished data). This low pressure applied in the teat walls might explain the non-increase of some of the thickness variables measured after hand milking (TEWA and TCL) and the swift recovery of those that underwent a slight increase (TWT and TWA).

#### Teat recovery time

In high-production dairy sheep flocks, milking is usually applied twice daily (Castillo et al. 2008). After conventional milking, the teat needs a few hours to recover its pre-milking state, and during this period the risk of microorganisms penetrating the teat canal and, in consequence, the risk of new intramammary infections, is increased (Hamann & Osteras, 1994). In practical situations, evaluating the changes in teat tissues is the most suitable method to estimate the degree of bacterial penetrability in the teat (Neijenhuis et al. 2001). To this end, it is important to know the teat tissue recovery time to establish an optimum interval between milkings.

The highest TWT, TWA, TEWA and TCL values were obtained immediately after milk extraction and diminished as of 1 or 2 h after extraction, depending on the method (LS, RC, HM and MM). In goats, Alejandro et al. (2014a) and Fahr et al. (2001) also found that the greatest values were

obtained after milking. In cattle, Neijenhuis et al. (2001) observed that the highest TWT value was obtained after milking and at 2 h in the case of TCL, whereas Ślósarz et al. (2010) and Wójtowski et al. (2006) obtained the highest TWT and TCL at 4 h after machine milking.

Teat recovery time varied depending on the extraction method, and the same method (machine milking) varied between the different trials. In EXP2 and EXP3 the TWT values were recovered between 4 and 6 h after milking. These values are similar to those reported by Wójtowski et al. (2006) in sheep, who reported that the TWT was recovered from 4 to 10 h after milking. In cattle, the TWT varied between 5 h (Gleeson et al. 2002) and 6 h (Neijenhuis et al. 2001). TWA presented a similar evolution to TWT, although the area of the walls was recovered 2 h (EXP2) and 1 h (EXP3) sooner than with mechanical milking.

TWT and TEWA were not recovered within the first 10 h after MM or LS (EXP1). This agrees with that found in goats by Alejandro et al. (2014a) who report that TWT and TWA are not recovered before 10 h with any extraction method (hand milking, mechanical milking, kid suckling and milk removal by catheter). The fact that TWT recovered at 4 and 6 h after MM in EXP3 and EXP2, respectively, but did not do so in EXP1 until after 10 h, even though the glands were milked in the same machine milking conditions, raises the hypothesis that the reason may be associated with the physiological features of the teats of the animals included in the experiment (closer to partum, offspring suckling on collateral gland, among others). This might also explain the non-recovery of TWT and TWA for more than 10 h in the teats suckled by lambs.

In the case of TEWA and TCL, the recovery time varied between the experiments. In EXP3 the values were recovered immediately after HM, whereas recovery time lasted up to 3 h with LS (EXP1) and 4 h with RC (EXP2). Wójtowski et al. (2006) indicate that TCL is recovered between 4 and 10 h after milking in sheep, although Alejandro et al. (2014a) in goats, affirm that TCL is not recovered before 10 h. In cattle, Gleeson et al. (2002) and Neijenhuis et al. (2001), report that TCL is recovered between 5 and 8 h after milking. According to Hamann & Mein (1990) and Gleeson et al. (2002), the differences in recovery time depend on the type of milking applied. However, the recovery time varied among trials using the milking method (machine milking), indicating that there are other factors that affect recovery time. Alejandro et al. (2014a) observed that the differences found in the teat tissue recovery pattern among the different physiological methods of extraction may be due to the differences in pressure exerted on the teat.

#### Conclusions

The increase in teat wall thickness and the recovery time for all the variables following mechanical milking was similar to that observed in comparison with the other three physiological methods of reference studied (lamb suckling, milk extraction by catheter and hand milking). So, it may be

concluded that machine milking, carried out in optimum conditions and respecting the time interval between milkings usually applied on sheep farms (8–12 h), would not affect teat integrity. Moreover, given the variability observed in teat thickness recovery time between the different experiments, further research should be carried out to study which factors intrinsic and extrinsic to the animal may affect the teat wall thickness and recovery time after machine milking.

The authors are grateful to Patrice Emery (ECM, France) for his collaboration and lending the ultrasound material used in this work. The study was supported by project AGL2006-06909 (Ministerio de Educación y Ciencia of Spain and FEDER).

## References

- Alejandro M, Roca A, Romero G & Díaz JR** 2014a Effects of milk removal on teat tissue and recovery in Murciano-Grandina goats. *Journal of Dairy Science* (in press)
- Alejandro M, Rodríguez M, Peris C & Díaz JR** 2014b Study of ultrasound scanning as method to estimate changes in teat thickness due to machine milking in Manchega ewes. *Small Ruminant Research* **119** 138–145
- Castillo V, Such X, Caja G, Casals R, Albanell E & Salama AA** 2008 Effect of milking interval on milk secretion and mammary tight junction permeability in dairy ewes. *Journal of Dairy Science* **91** 2610–2619
- Fahr R, Schulz J & Rosner F** 2001 Melkbedingte Veränderungen an der Sitzenspitze der Ziege [Milking associated changes of the teat end in goats]. *Tierärztliche Praxis* **29** G151–G156
- Gleeson DE, O'callaghan EJ & Rath MV** 2002 Effect of milking on bovine teat tissue as measured by ultrasonography. *Irish Veterinary Journal* **55** 628–632
- Hamann J & Burvenich C** 1994 Physiological status of the bovine teat. En: Teat Tissue reactions to machine milking and new infection risk. *International Dairy Federation* **297** 3–11
- Hamann J & Mein GA** 1988 Responses of bovine teat to machine milking. Measurement of changes in thickness of the teat apex. *Journal of Dairy Research* **55** 331–338
- Hamann J & Mein GA** 1990 Measurement of machine-induced changes in thickness of the bovine teat. *Journal of Dairy Research* **57** 495–505
- Hamann J & Osteras O** 1994 II Special aspects. In Teat Tissue reactions to machine milking and new infection risk. *International Dairy Federation* **297** 35–41
- Knizkova I, Kunc P, Broucek J & Kisac P** 2005 The effect of calf suckling and machine milking on bovine teats. In *Physiological and Technical Aspects of Machine Milking Proceedings of the International Conference held in Nitra, Slovak Republic, 26–28 April*, pp. 137–146 (Eds V Tancin, S Mihina & M Uhrincat). Villa del Ragno, Via Nomentana 134, 00162 Rome, Italy: ICAR
- Lefcourt AM** 1982 Rhythmic contractions of the teat sphincter in bovines: an expulsion mechanism. *The American Journal of Physiology* **242** R181–R184
- McDonald JS & Witzel DA** 1966 Differential pressures across the bovine teat canal during three methods of milk removal. *Journal of Dairy Science* **49** 176–178
- Neijenhuis F, Klungel GH & Hogeveen H** 2001 Recovery of cow teats after milking as determined by ultrasonography scanning. *Journal of Dairy Science* **84** 2599–2606
- Rasmussen MD & Mayntz M** 1998 Pressuer in the teat cistern and the mouth of the calf during suckling. *Journal of Dairy Research* **65** 685–692
- Ślósarz P, Wójtowski J, Bielińska S, Frackowiak A, Ludwiczak A, Krzyżewski J, Bagnicka E & Strzałkowska N** 2010 Machine induced changes of caprine teats diagnosed by ultrasonography. *African Journal of Biotechnology* **9** 8698–8703
- Svennersten K, Claesson C & Nelson L** 1990 Effect of local stimulation of one quarter on milk production and milk components. *Journal of Dairy Science* **73** 970–974
- van der Tol PPJ, Schrader W & Aernouts B** 2010 Pressure distribution at the teat-liner and teat-calf interfaces. *Journal of Dairy Science* **93** 45–52
- Wójtowski J, Ślósarz P, Bielińska S, Nowicki S, Gut A & Danków R** 2006 Ultrasound image of morphological changes of teat end in sheep caused by machine milking. *Archiv Tierzucht Dummerstorf* **49** (Special Issue) 231–237

**4.6. Effects of overmilking and liner type and characteristics on teat tissue in small ruminants**

Alejandro, M., Roca, A., Romero, G. y Diaz, J.R.,

Journal of Dairy Research, 2014 - 81: 215-222

DOI: <http://dx.doi.org/10.1017/S0022029914000077>





## Effects of overmilking and liner type and characteristics on teat tissue in small ruminants

Manuel Alejandro, Amparo Roca, Gema Romero and José-Ramón Díaz\*

Departamento de Tecnología Agroalimentaria, Escuela Politécnica Superior de Orihuela, Universidad Miguel Hernández de Elche, Ctra. Beniél, Km. 3,2, 03312 Orihuela, Alicante, Spain

Received 5 July 2013; accepted for publication 14 January 2014

The aim of this work was to study the effect on teat wall thickness and canal length in sheep and goats of overmilking for 2 min (OM+2) and of milking with used (AL; +3000 milkings) and twisted (TL; 45°) liners in sheep and goats, as well as the effect of milking goats with liners designed for sheep (SL, shorter length and diameter than liners for goats). To this end, we performed four experiments in goats and three in sheep, in a Latin square design with two experimental periods. During the experimental period 4 controls were carried out, performing ultrasound scans before and immediately after milking to determine the teat wall thickness (TWT), teat wall area (TWA), teat end area (TEWA) and teat canal length (TCL). OM+2 caused a significant increase in TWT, TWA, TEWA and TCL in goats and in TWA, TEWA and TCL in sheep. Liner features had a strong influence on the variables studied; aged liners caused significant changes in TWT and TCL in goats and in TWT in sheep; twisted liners produced a significant effect on the increase of TWT and TCL in goats, without reaching significance level in sheep; and milking goats with sheep liners led to a significant increase in TWT, TWA, TEWA and TCL. In practice, it is therefore important to avoid overmilking and the use of worn-out liners. It is also necessary to use liners designed for the morphological features of each species, taking special care to carry out periodic liner positioning revisions to ensure the benefits of pulsation on the teat end. Finally, it would be necessary to carry out long-term experiments to study whether the increase in thickness observed in some experiments is sufficient to affect milking efficiency and mammary gland health status.

**Keywords:** Aged liners, teat size, overmilking, congestion, ultrasound.

The pressure difference between the pulsation chamber and the liner interior (Hamann & Osteras, 1994) during machine milking, in combination with the liner's physical characteristics (wall thickness, material, tension, number of milking, etc.) affects the level of compression exerted on the inner teat tip tissues that helps re-evacuate the fluids in the teat (Mein & Reinemann, 2009) and thus to reduce the congestion/oedema that may occur.

During machine milking, teat wall thickness (TWT) is diminished in high flow periods and increased in periods of low flow and during overmilking (Isaksson & Lind, 1992). Overmilking is a troublesome issue because it affects teat condition and udder health (Rasmussen, 2004). Overmilking worsens the teat condition in the bovine: ring-shaped swelling at the teat base, teat discolouration and

inflammation are increased (Hillerton et al. 2002). Moreover, continuous overmilking for 4 months causes more damage to the epithelial lining, higher teat sinus injury and greater keratin loss than normal milking (Gleeson et al. 2003). In milking parlours where automatic cluster removal is not installed, there is some level of overmilking (Gleeson et al. 2003). This is important in small ruminants, as the level of automation on farms is low (Díaz et al. 2004; Gutierrez & Romero, 2006) and the presence of automatic cluster removers is scarce (Menzies, 2000; Tangorra et al. 2012), increasing the risk of overmilking.

The negative effect of overmilking may be aggravated when the vacuum level is too high or teat massage decreases. This lack of massage can be due to the use of unsuitable liners for the teat size (Rasmussen, 2004). The use of too short liners affects the number of intramammary infections and increases the incidence of petechial haemorrhages (Mein et al. 1983). Teats that are too short or too long for a given liner will not receive the full benefit

\*For correspondence; e-mail: jr.diaz@umh.es

of the pulsation characteristics, as the liner will not compress the teat end (Mein et al. 2003). In Spain, some of the first goat milking machines were installed with liners for sheep, owing to the low market availability of liners specifically designed for goats, and although these are currently now available, it is still common to find goats being milked with sheep liners, especially in mixed flocks of goats and sheep. Moreover, it is known that through use liners undergo changes in the physical (flexibility increases, tension is reduced and changes occur in the body length; Davis et al. 2000) and chemical properties (loss of plasticising and antidegradant; Boast et al. 2008). Liner deterioration takes place gradually until the end of their useful life is reached, with observable changes in performance (Hillerton et al. 2004) giving rise to effects on the teat similar to those caused by pulsation failure (Boast et al. 2008). Additionally, we frequently come across liners twisted around their axis, especially when the liner tension has diminished through use, which has a great influence on the milking conditions and udder health (IDF, 2006).

Because there is scant information available on the effect of overmilking and liner characteristics on teat condition in small ruminants, we designed 7 experiments (4 in goats and 3 in sheep) to study the effect on teat wall thickness and teat canal length in goats and sheep of overmilking for 2 min, of milking with used (+3000 milkings) and twisted (45°) liners in goats and sheep, as well as the effect of milking goats with liners designed for sheep.

## Materials and methods

### *Farm and animal management*

The trials were carried out at the Training and Research Farm of Escuela Politécnica Superior de Orihuela (EPSO) belonging to the Universidad Miguel Hernández de Elche (UMH). The Murciano-Granadina goats and Manchega breed sheep were kept in loose housing, with daytime access to the exercise pens. Goats were machine milked once daily, always in the morning, while sheep were milked twice a day. The milking installation was Low Line (LB) (1×12×12), with electronic milk meters (Dematron 60, Gea Farm Technologies, Bönen, Germany). The Lactoflow devices incorporated in the Dematron 60 were programmed to cut off the milking vacuum level with the following parameters: milk flow rate 100 ml/min and delay time 20 s. For the experiments, we used teatcup with silicon liners especially designed for goats (Top Flow Z) and sheep (Top Flow S) (Gea Farm Technologies, Bönen, Germany). The experimental milking parameters used were: in goats, vacuum level of 40 kPa, VL; pulsation rate 90 ppm, PR; pulsation ratio 60%, PRT. In sheep, VL 36 kPa; PR 180 ppm; PRT 50%.

The machine milking routine for the animals consisted of teatcup attaching, mechanical milking and teatcup removal. Finally, after milking teats were immersed in an iodine solution.

### *Experimental design*

The animals were milked until the start of each experiment with the most beneficial treatment for milking efficiency and the health state of the animal (without overmilking, new, well-placed liners and suitable teat clusters for the species). Sampling was performed before the start of each experiment, taking aseptic samples for bacteriological analysis and a milk sample for SCC (Fossomatic-5000; Foss-Electric S.A). Bacteriological analysis was carried out previous to milking from samples of milk obtained of teats carefully cleaned with 70% ethanol, discarding the first three streams of foremilk. Approximately 5 ml of milk were collected aseptically from each gland. Samples were kept at 4 °C for a maximum of 6 h until bacteriological analysis. Twenty µl of each sample were plated on blood agar plates (5% washed sheep erythrocytes; Biomerieux, Lyon, France). The plates were incubated aerobically at 37 °C and examined after 24, 48 and 72 h. Cultures with five or more identical colonies were considered positive for intramammary infection (IMI). If a gland did not have IMI and SCC was lower than 400 000 cells/ml in ewes and 1 000 000 cell/ml in goats, it was considered as free from mastitis. All animals included in the experiments were free from mastitis. Each experiment had a 2-d pre-experimental period where the animals continued to be milked under these conditions.

**Overmilking.** In goats (EXP 1), 24 animals (12 per batch) in their seventh month of lactation (milk yield, MY: 1.8±1.2 l; milking time, MT: 147.2±80.9 s) were used. In sheep (EXP 2), 22 ewes (11 per batch) in their third month of lactation were used (MY: 0.9±0.3 l; MT: 67.3±24.3 s). The experiment used a cross-over design with two treatments (without overmilking and 2 min overmilking) and two periods (2×4 d in goats; 2×4 d in sheep). Overmilking was applied after milk flow ceased in the transparent short milk tube, after observing that the automatic vacuum cutting device (Lactoflow) was triggered.

**Liner age.** The new liners used were TopFlow Z and TopFlow S models for goats (EXP 3) and sheep (EXP 4), respectively (Gea-Westfalia-Surge, Bönen, Germany), whereas the used liners had undergone 1.5 years of use and over 3000 milkings. The line features are shown in Table 1. In goats, 20 animals (10 per batch) in their seventh month of lactation were used (MY: 1.8±1.3 l; MT: 131.7±68.7 s). In sheep (EXP 4), the 22 ewes (11 per batch) were in their third month of lactation (MY: 1.1±0.5 l; MT: 59.7±27.3 s). The design was cross-over with two treatments (new liners and naturally aged liners) and 2 periods (2×8 d in goats; 2×6 d in sheep).

**Twisted liner.** In goats (EXP 5), 22 animals (11 per batch) in their sixth month of lactation were used (MY: 2.0±1.2 l; MT: 144.5±82.3 s). In sheep (EXP 6), the 20 ewes (10 per batch) were in the second month of lactation (MY: 1.2±0.4 l;

**Table 1.** Features of the goat and sheep liners used

	Liner			
	Goat		Sheep	
	New	Aged	New	Aged
<i>Mouthpiece</i>				
External width, mm	58.5±0.1	58.5±0.1	48±0.1	48±0.1
Bore, mm	22±0.1	22±0.1	18±0.1	18±0.1
<i>Lip</i>				
Length, mm	12.6±0.1	12.6±0.1	8±0.1	8±0.1
Thickness, mm	2.3±0.1	2.3±0.1	1.5±0.1	1.5±0.1
Flex, mm	15±2	19.2±1.8	12±1.7	14.7
<i>Cavity</i>				
Height, mm	12.5±0.1	12.5±0.1	6.7±0.1	6.7±0.1
<i>Barrel</i>				
Bore at the top of the barrel, mm	27±0.1	27±0.1	20±0.1	20±0.1
Bore at the bottom of the barrel, mm	18.5±0.1	18.5±0.1	18±0.1	18±0.1
Length, mm	107±0.2	110±1.1	93±0.2	95±0.9
Minimum bore at the end of the liner, mm	12.5±0.1	12.5±0.1	12.5±0.1	12.5±0.1
Touch Point, kPa	13±0.2	9±0.3	13±0.2	9±0.3

68.4±23.0 s). We used a cross-over design with two treatments (liners positioned correctly on the teatcup and liners twisted 45° around their access) and two periods (2 × d in goats; 2 × 6 d in sheep).

**Liner type.** The 20 goats (10 per batch) used were in their six month of lactation (EXP 7; MY: 1.7±1.2 l; MT: 160.8±79.8 s). The design was cross-over with two treatments (goat teatcups and sheep teatcups) and two periods (2 × 7 d).

#### Measured variables

The sampling days were the same in all experiments. On the second day of the pre-experimental phase, pre-and post-milking ultrasound scans were taken of the glands of all animals included in the experiments. During the experimental phase, a total of 4 controls were carried out; 2 checks on the two days prior to interchanging the glands (first period) and two checks on the two last days at the end of the experiment (second period). During these controls, ultrasound scans were performed before and after milking.

In all the controls, the MY (l) recorded on the electronic meters was noted and the MT (s) for each gland was monitored using a chronometer.

Ultrasound scanning was performed by the methodology described by Díaz et al. (2013) in goats. Measurements in sheep were taken following the same method as in goats, but adapted to this species by the authors Alejandro et al. (2014). The main difference is that the teat wall thickness measurement (TWT) in sheep is taken at 1.5 cm from the teat end, whereas in goats it is performed at 1 cm, because the teat sphincter length is greater in sheep. An Agroscaan AL

portable ultrasound unit (ECM, Noveko International Inc., France) was used, fitted with a 5-MHz linear probe: the ultrasound images obtained were recorded on videotape and digitally scanned with the Windows Movie Maker program. The images were processed with an IT program specifically designed to this end by the research team (ECOTEAT®) to obtain the following measurements: teat wall thickness (TWT, mean value of the two walls examined, cm), area of the teat walls (TWA, cm<sup>2</sup>), teat end area (TEWA, cm<sup>2</sup>) and teat canal length (TCL, cm). Thickness increment values were obtained by means of the following formula: Increment (%): 100\*(after milking – before milking)/before milking.

At the start of the seventh experiment (sheep teatcup) the teat morphology of the animals were checked, measuring length and diameter.

#### Liner characteristics

Liner measurements were taken using a pair of callipers following the scheme described by Fernandez et al. (1997). The touch point (TP) with the aid of a manual vacuum pump (Meditation Precision S.L., Zaragoza, Spain), a digital vacuum gauge (DVPM-01, Delaval International AB., Tumba, Sweden) and a methacrylate cover. The mouthpiece lip flex was measured using method described by Davis et al. (1999).

#### Statistical analysis

The association between the explanatory variables and teat tissue variables measured before and after milking and for the thickness increment were assessed using a stepwise

**Table 2.** Effect of overmilking (+2 min) on teat wall thickness in goats and sheep ( $n=96$  for goats;  $n=88$  for sheep)

	Goat			Sheep		
	Without overmilking	2 min overmilking	LS	Without overmilking	2 min overmilking	LS
<i>Before milking</i>						
Teat wall thickness, cm	0.44±0.01	0.44±0.01	ns	0.40±0.02	0.41±0.02	ns
Teat wall area, cm <sup>2</sup>	0.86±0.01	0.87±0.01	ns	1.40±0.04	1.41±0.04	ns
Teat-end area, cm <sup>2</sup>	0.71±0.02	0.69±0.02	ns	1.04±0.06	1.01±0.06	ns
Teat canal length, cm	0.71±0.01	0.70±0.01	ns	0.94±0.03	0.92±0.03	ns
<i>After milking</i>						
Teat wall thickness, cm	0.56±0.01	0.61±0.01	***	0.57±0.02	0.59±0.02	*
Teat wall area, cm <sup>2</sup>	0.96±0.01	1.00±0.01	***	1.60±0.03	1.64±0.03	*
Teat-end area, cm <sup>2</sup>	0.84±0.02	0.89±0.02	***	1.25±0.05	1.32±0.05	ns
Teat canal length, cm	0.80±0.01	0.83±0.01	*	1.10±0.02	1.13±0.02	ns
<i>Increment (%)</i>						
Teat wall thickness	30.58±3.72	39.18±3.75	**	46.82±6.67	54.03±6.67	ns
Teat wall area	11.81±1.56	16.28±1.56	**	15.57±2.80	20.10±2.80	*
Teat-end area	21.76±3.43	33.82±3.43	**	28.19±6.43	43.56±6.43	*
Teat canal length	14.50±2.58	21.59±2.58	*	20.06±4.19	30.18±4.19	*

LS: Level of significance.

\* $P<0.05$ ; \*\* $P<0.01$ ; \*\*\* $P<0.001$ ; ns: non significant ( $P>0.05$ )

linear mixed model procedure. Factors and first-order interaction terms that were significant at a  $P$ -value  $<0.05$  were included in the final model (Proc Mixed, SAS Institute Inc, V.9.1. 2002). TWT, TWA, TEWA and TCL were included as outcome variables and the following as explanatory variables: Treatment, TRT with 2 levels, EXP 1 and 2 (1: overmilking, 2: without overmilking); EXP 3 and 4 (1: aged liner, 2: new liner); EXP 5 and 6 (1: twisted liner, 2: non twisted liner); EXP 7 (1: sheep teatcup, 2: goat teatcup); Period (PER, 2 levels: 1: first period and 2: second period); Day nested at PER (PDAY, 2 levels: 1: first day in both period, 2: second day in both periods); the interaction of PER with TRAT; and milk yield (MY) and milking time (MT) as a covariate. Goat and gland nested goat were considered as random terms. In addition, a compound symmetry covariance structure was used to account for the repeated measurements. The model using this hierarchical structure provided the best fit for the variable when compared with different models considering other covariance and hierarchical structures (as assessed using Bayesian and Akaike information criteria).

## Results

In the analysis of the TWT, TWA, TEWA and TCL values recorded in the pre-experimental period of each experiment, no significant differences were observed in any of the variables recorded between the left and right gland of the animals, nor between the glands of the animals included in the two experimental batches (data not shown).

### Overmilking

Table 2 shows the TWT, TWA, TEWA and TCL before and after milking, and the increments of the different

variables in sheep and goats milked with and without overmilking. In goats, overmilking for 2 min caused a greater increase ( $P<0.05$ ) in TWT, TWA, TEWA and TCL after milking than in those milked normally, so the increases in the variables after milking were significantly greater in the overmilked glands.

In sheep, overmilking for 2 min led to a greater increase in TWT and TWA ( $P<0.05$ ) after milking, whereas TEWA and TCL were not affected. However, the increase in TWT did not vary significantly between the overmilked glands and those milked correctly, whereas significant differences were found in the increments of TWA, TEWA and TCL.

### Liner age

Table 3 shows TWT, TWA, TEWA and TCL, before and after milking, and the increments of these variables in sheep and goats milked with new liners and naturally aged liners. In goats, higher values of TWT and TCL were observed after milking with aged liners. Greater increments were also appreciated in TWT and TCL with the aged liners ( $P<0.05$ ).

In the Manchega ewes, the line used only affected TWT (after milking and in the increment), showing higher values ( $P<0.05$ ) than when milking was performed with new liners.

### Twisted liners

In goats, 2 animals suffered intramammary infection of the gland milked with the 45° twisted liners during the first experimental period and were removed. Table 4, shows that after milking the only significant differences observed were in TCL ( $P<0.05$ ), although when the increments were observed the use of twisted liners gave higher values in TWT and TCL.



**Table 3.** Effect of ageing liner (>3000 milkings) on teat wall thickness in goats and sheep ( $n=80$  for goats;  $n=88$  for sheep)

	Goat			Sheep		
	New liner	Aged liner	LS	New liner	Aged liner	LS
<i>Before milking</i>						
Teat wall thickness, cm	0.44±0.01	0.43±0.01	ns	0.41±0.02	0.42±0.02	ns
Teat wall area, cm <sup>2</sup>	0.88±0.01	0.87±0.01	ns	1.41±0.04	1.42±0.04	ns
Teat-end area, cm <sup>2</sup>	0.76±0.02	0.73±0.02	ns	1.03±0.05	1.04±0.05	ns
Teat canal length, cm	0.76±0.02	0.74±0.02	ns	0.94±0.03	0.95±0.03	ns
<i>After milking</i>						
Teat wall thickness, cm	0.56±0.01	0.59±0.01	***	0.51±0.02	0.55±0.02	**
Teat wall area, cm <sup>2</sup>	0.99±0.02	0.98±0.02	ns	1.56±0.03	1.57±0.03	ns
Teat-end area, cm <sup>2</sup>	0.88±0.02	0.91±0.02	ns	1.19±0.05	1.20±0.03	ns
Teat canal length, cm	0.83±0.02	0.88±0.2	**	1.04±0.03	1.07±0.03	ns
<i>Increment (%)</i>						
Teat wall thickness	33.57±2.95	40.10±2.95	*	26.95±3.30	34.95±3.30	*
Teat wall area	11.83±1.71	13.30±1.71	ns	11.27±1.75	11.52±1.74	ns
Teat-end area	21.54±4.50	30.10±4.50	0.057	18.96±3.88	20.49±3.88	ns
Teat canal length	11.32±3.10	23.36±3.10	**	12.94±2.76	16.15±2.76	ns

LS: Level of significance.

\* $P<0.05$ ; \*\* $P<0.01$ ; \*\*\* $P<0.001$ ; ns: non significant ( $P>0.05$ )**Table 4.** Effect of liner position on teat wall thickness in goats and sheep ( $n=80$  for goats;  $n=80$  for sheep)

	Goat			Sheep		
	Correctly positioned	Twisted liner	LS	Correctly positioned	Twisted liner	LS
<i>Before milking</i>						
Teat wall thickness, cm	0.41±0.01	0.40±0.01	ns	0.43±0.02	0.41±0.02	ns
Teat wall area, cm <sup>2</sup>	0.84±0.02	0.83±0.02	ns	1.45±0.05	1.41±0.05	ns
Teat-end area, cm <sup>2</sup>	0.67±0.02	0.65±0.02	ns	1.09±0.07	1.04±0.07	ns
Teat canal length, cm	0.69±0.02	0.67±0.02	ns	0.98±0.04	0.95±0.04	ns
<i>After milking</i>						
Teat wall thickness, cm	0.54±0.01	0.56±0.01	ns	0.53±0.02	0.56±0.02	ns
Teat wall area, cm <sup>2</sup>	0.95±0.02	0.95±0.02	ns	1.57±0.03	1.59±0.03	ns
Teat-end area, cm <sup>2</sup>	0.81±0.02	0.84±0.02	ns	1.17±0.05	1.26±0.05	ns
Teat canal length, cm	0.79±0.02	0.83±0.02	*	1.05±0.03	1.11±0.03	ns
<i>Increment (%)</i>						
Teat wall thickness	36.18±4.36	44.91±4.37	*	27.78±5.39	37.13±5.39	ns
Teat wall area	14.69±1.98	15.87±1.98	ns	10.00±2.37	14.24±2.37	ns
Teat-end area	29.47±5.23	38.48±5.23	ns	19.67±9.19	30.20±9.19	ns
Teat canal length	18.56±3.40	28.80±3.40	**	13.02±6.71	23.08±6.71	ns

LS: Level of significance.

\* $P<0.05$ ; \*\* $P<0.01$ ; ns: non significant ( $P>0.05$ )

In sheep, no significant differences were observed after milking in any variable between animals milked with twisted liners and those milked with correctly positioned ones.

### Teatcup

Average teat length of the goats included in the experiment was 40.9 mm (range 20.3–62.7 mm). Teat base diameter was 37.4 mm (range 11.2–73.6 mm) and the diameter at the tip was 7.03 mm (range 4.8–9.9 mm). Table 5 shows TWT, TWA, TEWA and TCL before and after milking, as well as the

increments in teat thickness in goats milked with teatcups for goats and for sheep. Milking goats with teatcups for sheep caused a higher increase in all the post-milking variables studied. Significant differences were also found in the increments in the variables recorded after milking compared with their initial values.

### Discussion

Overmilking for 2 min in sheep and goats increased the degree of teat end congestion/oedema, showing an increase

**Table 5.** Effect of milking with sheep and goat liners on teat wall thickness in goats ( $n=80$ )

	Teatcup		LS
	Goat	Sheep	
<i>Before milking</i>			
Teat wall thickness, cm	0.42±0.01	0.41±0.01	ns
Teat wall area, cm <sup>2</sup>	0.83±0.01	0.83±0.01	ns
Teat-end area, cm <sup>2</sup>	0.66±0.02	0.67±0.02	ns
Teat canal length, cm	0.69±0.02	0.69±0.02	ns
<i>After milking</i>			
Teat wall thickness, cm	0.55±0.01	0.59±0.01	***
Teat wall area, cm <sup>2</sup>	0.94±0.02	0.98±0.02	***
Teat-end area, cm <sup>2</sup>	0.79±0.02	0.90±0.02	***
Teat canal length, cm	0.78±0.01	0.85±0.01	***
<i>Increment (%)</i>			
Teat wall thickness	34.52±3.62	45.47±3.62	**
Teat wall area	13.48±2.25	19.25±2.25	**
Teat-end area	26.71±5.84	42.38±5.84	**
Teat canal length	17.14±3.36	27.21±3.36	**

LS: Level of significance.

\*\* $P<0.01$ ; \*\*\* $P<0.001$ ; ns: non significant ( $P>0.05$ )

in the values for TWA, TEWA and TCL in both species, in addition to an increase of TWT in goats compared with normal milking. This agrees with the results obtained by Isaksson & Lind (1992) in the bovine, where TWT, measured by cutimeter, was greater with overmilking. Using an ultrasound technique, Pařilova et al. (2011) found similar results in Holstein cows, while Gleeson et al. (2002) reported that overmilking for 5 and 8 min in Holstein cows caused a linear increase in TWT, although this was not significant, and Paulrud et al. (2005) indicated that overmilking tended to increase TWT ( $P=0.066$ ) and TCL. The increase in thickness may effect the teat defence mechanisms, raising the likelihood of new intramammary infections (Neijenhuis et al. 2001). Moreover, owing to the low or non-existent milk flow, a reverse pressure gradient may occur, allowing bacteria to enter the teat cistern (Rasmussen et al. 1994). During overmilking, the average vacuum level in the teat is greater, as there is no milk flow to help dissipate the vacuum, and if this occurs frequently it may lead to capillary damage (Hillerton et al. 2002). Gleeson et al. (2003) reported that overmilking for 5 min over 4 months caused greater damage in the teat cistern and a greater loss of keratin than milking with automatic removal (0.2 kg/min.).

In addition to overmilking, another factor with a negative influence on teat tissues in goats and sheep is the utilisation of used liners (+ 3000 milkings), as TWT is increased in both species, as is TCL in goats. These outcomes coincide with those described by Boast et al. (2008) in the bovine, indicating that the use of worn liners (+ 5000 milkings) causes similar effects in the teats to those due to pulsation failure. There may be two different explanations for this. The first is associated with reduction of the mounting tension of the liners through use, which diminishes the liner

compression (LC) applied to the teat (Mein et al. 2003). In this work, we found a 3% increase in liner length, a lower percentage than reported by other authors using rubber liners (Davis et al. 2000; Boast et al. 2008), so it is possible that this stretching may not have affected the liner mounting tension to any great extent. The second is based on the fact that when the liners are nearing the end of their useful life, the body shape becomes slightly oval, which reduces wall resistance to collapse, diminishing the touch point (TP). As the TP is reduced, the residual vacuum available for massage increases, thereby raising the LC above the standard values in one milking (Mein & Reinemann, 2009). In this experiment, the TP of the used liners was lower than that of the new liners, which might indicate that during milking a greater than optimum LC was applied, affecting the teat tissues. Although the manufacturer warns that TP is not a good indicator of wear and tear on silicone liners, as it does not change through use (Gea Farm Technologies, Bonen, 2010), other authors (Spencer et al. 2007) have reported that the TP (25.52 kPa) of triangular-closure silicon liners after more than 3000 milkings is lower than that of new liners (33.52 kPa). It is important to note that the manufacturer recommends changing the liners after 1500 working hours, or at least every year. Although the liners used in this experiment were nearing the end of their useful life (1500 h), they had been in use for over 18 months, which may have led to worsening of their physical and chemical properties, possibly leading to alterations in the fluid dynamics at tissue level in the teat end and walls.

With normal use of the milking machine through time, it is possible to find twisted liners, especially when the line tension has diminished owing to use. In the case of transparent plastic cups it is easy to detect, but in cups manufactured with opaque materials it would be necessary to carry out a periodical revision of the liner placement to avoid this, since in the experiments carried out in goats we observed an effect on the increase in TWT and TCL. Twisted liners hinder the movement of the line walls owing to the liner torsion, which can increase the tension on the walls and affect liner collapse on the teat tip. In sheep, no significant differences were found in the increment of the different variables, although a greater difference was observed (measured after – before milking) in TEWA and TCL (data not shown).

Liner design has a greater effect on milking characteristics than any other factor of the milking machine (Mein et al. 2003). In the first milking machines in Spain, teatcups for sheep were installed owing to the lack of commercial availability of teatcups specifically designed for caprine livestock, which led to some farmers continuing to use them even though there are currently several teatcup models designed for goats. This same practice is carried out in mixed flocks of sheep and goats where there is a greater number of animals of the former species. In this sense, in the fieldwork of the research team under the 'Milk Quality Improvement Programmes' carried out by two goat farming associations from the Murcia region, more than 60% of the goat farmers

were still using sheep teatcups (Díaz, personal communication). For the pulsation to be effective and able to apply the compression load to the teat tissues, the liner must be able to collapse totally beneath the teat. To do so, the liner barrel must be 25 mm longer than the teat at this stage, especially if we take into account that at the onset of milking bovine teats increase in length by around 40–50% (Mein, 1992). In this regard, Rønningen & Reitan (1990) indicated that in the bovine the teat penetration depth is positively correlated with hardening of the teat upon palpation and with the incidence rates of clinical mastitis.

If we extrapolate these data to the conditions of the present work, it can be estimated that sheep liners would not have a long enough body for milking of teats of over 48 mm ( $93 - 25 = 68$  mm;  $68 \text{ mm}/40\text{--}50\% = 45\text{--}48$  mm). In this work, around 21% of teats exceeded the length of 48 mm and more than 42% were over 45 mm long (data not shown). Thus, a sheep liner would not properly perform the massage on the teat end in a high percentage of goats.

Choosing the ideal liner is determined by teat size (Fernandez et al. 1997). Peris et al. (1999) recommended liners at least 120 mm in length for suitable milking of Murciano-Granadina goats, data in line with those found in this work, where the liners were 119.5 mm in length (107 mm barrel length + 12.5 mm cavity height).

## Conclusions

The inappropriate use of liners whose useful life has expired, badly positioned in the cup (twisted) or not designed for the species to be milked, can affect the teat tissues. Likewise, the use of an unsuitable milking routine that leads to overmilking can cause congestion and oedema in the teat tissues, which may alter the defence mechanisms against intramammary infections. Long-term experiments (throughout lactation) are required to determine whether the increase in thickness observed in some experiments is sufficient to affect milking efficiency and mammary gland health status.

The authors are grateful to Patrice Emery (ECM, France) for his collaboration and providing the ultrasound material used in this work. The study was supported by project AGL2006-06909 (Ministerio de Educación y Ciencia of Spain and FEDER/ERDF).

## References

- Alejandro M, Rodriguez M, Peris C & Díaz JR 2014 Study of ultrasound scanning as method to estimate changes in teat thickness due to machine milking in Manchega ewes. *Small Ruminant Research* (in press).
- Boast D, Hale M, Turner M & Hillerton JE 2008 Variation in rubber chemistry and dynamic mechanical properties of the milking liner barrel with age. *Journal of Dairy Science* **91** 2247–2256
- Davis M, Reinemann D & Mein G 1999 Measurement of change of liner properties with age. Presented at The ASAE Annual International Meeting, Toronto, Canada Paper 99-3017 ASAE St Joseph MI
- Davis M, Reinemann D & Mein G 2000 Relationships between physical characteristics and milking characteristics of the aging milking liner. Presented at The ASAE Annual International Meeting, Milwaukee Paper 00-3014 ASAE St Joseph MI
- Díaz J, Romero G, Perez M, Soriano J, Moya F, Peris C & Fernández N 2004 *Characterization of Mechanical Milking Goat Farms in the Region of Murcia. I Parlours and Types of Machines*. Libro de actas de XXIX Jornadas Científicas y VII Internacionales de la SEOC. Lleida, Spain: Lleida Diputació de Lleida
- Díaz JR, Alejandro M, Peris C & Fernández N 2013 Use of ultrasound scanning to estimate teat wall thickness in Murciano-Granadina goats. *Livestock Science* **155** 114–122
- Fernandez N, Requena R, Beltran M, Peris C, Rodríguez M, Molina P & Torres A 1997 Comparison of different machine milking clusters on dairy ewes with large size teats. *Annales de Zootechnie* **46** 207–218
- Gleeson DE, O'callaghan EJ & Rath MV 2002 Effect of milking on bovine teat tissue as measured by ultrasonography. *Irish Veterinary Journal* **55** 628–632
- Gleeson DE, Jilroy D, O'Callaghan EJ, Fitzpatrick E & Rath MV 2003 Effect of machine milking on bovine teat sinus injury and teat canal keratin. *Irish Veterinary Journal* **56** 46–50
- Gutierrez J & Romero G 2006 *Characteristics of the Milking Parlours in the Farm of the National Association of Churra Sheep (ANCHE)*. Libro de actas de XXXI Jornadas Científicas y X Internacionales de la SEOC. Castilla y León, Zamora, Junta de Castilla y León
- Hamann J & Osteras O 1994 II special aspects in: teat tissue reactions to machine milking and new infection risk. *International Dairy Federation* **297** 35–41
- Hillerton J, Pankey J & Pankey P 2002 Effect of over-milking on teat condition. *Journal of Dairy Research* **69** 81–84
- Hillerton JE, Boast D, Middleton N & Ohnstad I 2004 Changes in milking liner performance with age. In: 100 Years with Liners and Pulsators in Machine Milking. *IDF Bulletin No 388*, International Dairy Federation, Brussels, Belgium 35–40
- International Dairy Federation 2006 Continuous monitoring of machine milking. *Bulletin of the international Dairy Federations* **404** 1–30
- Isaksson A & Lind O 1992 Teat reactions in cows associated with machine milking. *Journal of Veterinary Medicine* **39** 282–288
- Mein GA 1992 Action of the cluster during milking. In *Machine Milking and Lactation*, pp. 97–140 (Eds AJ Bramley, FH Dodd, GA Mein & JA Bramley), Berks, UK: Insight Books
- Mein GA & Reinemann DJ 2009 Biomechanics of milking: teat – liner interactions. Paper number 09743 presented at The 2009 ASABE Annual International Meeting, Reno, Nevada. ASABE St Joseph MI
- Mein GA, Brown M & Williams D 1983 Pulsation failure as a consequence of milking with short cup liners. *Journal of Dairy Research* **50** 249–258
- Mein GA, Williams D & Reinemann DJ 2003 Effects of milking on teat-end hyperkeratosis: I Mechanical forces applied by the teatcup liner and responses of the teat. In National Mastitis Council Regional Meetings Proceedings, pp. 114–123. Fort Worth, TX, Madison, WI: National Mastitis Council
- Menzies PI 2000 Mastitis of sheep-overview of recent literature. In *Proceedings of the 6th Great Lakes Dairy Sheep Symposium*, pp. 68–76. Guelph
- Neijenhuis F, Klungel GH & Hogeveen H 2001 Recovery of cow teats after milking as determined by ultrasonography scanning. *Journal of Dairy Science* **84** 2599–2606
- Pařilova M, Stadnik L, Jeřkova A & Štolc L 2011 Effect of milking vacuum level and overmilking on cow's teat characteristics. *Acta universitatis agriculturae et silviculturae mendelianae brunensis* **LIX**, pp. 193–202
- Paulrud C, Clausen S, Andersen PE & Rasmussen MD 2005 Infrared thermography and ultrasonography to indirectly monitor the influence of liner type and overmilking on teat tissue recovery. *Acta Veterinaria Scandinava* **46** 137–147
- Peris S, Caja G & Such X 1999 Relationships between udder and milking traits in Murciano-Granadina dairy goats. *Small Ruminant Research* **33** 171–179



- Rasmussen MD** 2004 Overmilking and teat condition. National Mastitis Council, Annual Meeting Proceedings, pp. 169–175
- Rasmussen MD, Frimer ES & Decker EL** 1994 Reverse pressure gradients across the teat canal related to machine milking. *Journal of Dairy Science* **77** 984–993
- Rønningen O & Reitan A** 1990 Influence of static and dynamic teat characteristics and milking time on udder health in Norwegian red cattle. *Journal of Dairy Research* **57** 171–177
- Spencer S, Shin JW, Rogers G & Cooper J** 2007 Effect of vacuum and ratio on the performance of a monoblock silicone milking liner. *Journal of Dairy Science* **90** 1725–1728
- Tangorra F, Costa A & Guidobono A** 2012 Preliminary results of a field study on goats milk yield and lactation persistency as affected automatic cluster removals. International Conference Ragusa, Italy Work Safety and Risk Prevention in Agro-food and Forest Systems, pp. 592–598





***5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN***



## **5.1. Puesta a punto de la técnica, determinación de la frecuencia de exploración más adecuada y comparación con otros métodos. Artículos 1, 2 y 3.**

### **5.1.1. Objetivos planteados en los artículos 1, 2 y 3.**

En los artículos 1 y 2, con el fin de valorar la técnica de la ecografía como un método de estimación del espesor del pezón en ovejas de raza Manchega y cabras Murciano-Granadinas, se llevaron a cabo distintos experimentos en donde se plantearon tres objetivos: 1) Estudio 1; E1 y E2: estudiar la frecuencia de exploración ecográfica más adecuada; 2) Estudio 2; E3, E4 y E5: efecto del operario en la aplicación de la técnica; 3) Estudio 3: E6 y E7: validar el método comparándolo con las mediciones realizadas con otro método de estimación (cutímetro) y realizando exploraciones ecográficas en ganado vacuno con la misma metodología. Para ello se diseñaron 3 estudios.

En el primer estudio se realizaron 2 experimentos: E1: en el primero se ensayaron las frecuencias de 5, 7,5 y 10 MHz en cabras y 5 y 7,5 MHz en ovejas; E2: en el segundo se ensayaron las frecuencias de 3,5 y 5 MHz.

En el segundo estudio, 2 operarios diferentes e independientemente realizaron ecografías en los mismos animales (E3), eligieron la mejor imagen de exploraciones ecográficas grabadas en video (E4) y realizaron mediciones en imágenes ecograficas (E5).

En el tercer estudio, para validar el método ecográfico, se realizó exploraciones ecográficas en 10 vacas Holstein utilizando la misma técnica desarrollada para ganado caprino (E6 en artículo 1). Por último, se realizaron mediciones con cutímetro en las cabras y ovejas (E7 en artículo 1 y E6 en artículo 2).

En el artículo 3, se definieron tres objetivos: (1) Poner a punto la técnica de medición de temperatura sobre las imágenes termográficas; (2) Estudiar el efecto del estado sanitario de la glándula mamaria en la aplicación de la técnica; (3) Estudiar la relación entre la termografía y la ecografía como métodos de estimación del efecto del

ordeño mecánico sobre el espesor de las paredes del pezón. Se realizaron imágenes termográficas en las dos glándulas y ecografías de los 2 pezones en 30 cabras de raza Murciano-Granadina de distinto número de parto, antes y después del ordeño y se clasificaron los animales en función del estado sanitario de la glándula mamaria. (FREE: Recuento de células somáticas (RCS) < 1000000 cells/mL y bacteriología negativa; INF: infectadas, bacteriología positiva; UNS: mamitis inespecíficas, RCS > 1000000 cells/mL y bacteriología negativa). Se determinó en las imágenes termográficas la temperatura en puntos y áreas concretas del pezón (en la punta; a 1 cm; a 2 cm y a 3 cm de la punta del pezón) y de la ubre. Además, se determinó el espesor de las paredes del pezón, el área de las paredes y de la punta del pezón en las imágenes ecográficas del pezón.

### **5.1.2. Frecuencia de exploración**

El canal del pezón no fue visible con claridad en todas las imágenes ecográficas realizadas. En cabras, sólo en el 7% de las imágenes antes del ordeño se pudo distinguir el canal del pezón, mientras que después del ordeño el porcentaje aumentó hasta el 16%. En ovejas, el porcentaje de imágenes en donde se pudo distinguir el canal del pezón fue, aproximadamente, del 50% y 70% antes y después del ordeño respectivamente. Estos resultados de porcentajes del canal del pezón observados en ovinos son similares a los encontrados por Franz et al. (2003).

En las ecografías realizadas con las frecuencias de 5 y 7,5 MHz en cabras y ovejas se pudieron distinguir con claridad tres capas en la pared del pezón: la capa externa (epidermis) como una línea delgada de color blanco, la capa media (tejido músculo fibroso y vascular) como una zona ancha de color blanco-gris con pequeñas zonas anecogénicas, y la capa interna (mucosa epitelial) como una muy delgada línea blanca (Figura 2a, 2b, 2d y 2e – Artículo 1; Figura 2a, 2b, y 2c – Artículo 2).

Con la frecuencia de 10 MHz no se pudieron obtener imágenes de calidad de los pezones de ovejas Manchegas, debido a que las paredes de la punta del pezón y la pared inferior de la cisterna del pezón no se podían visualizar. En ganado caprino, al utilizar la

frecuencia de 10 MHz, la capa interna de la pared del pezón no se distinguió con claridad (Figura 2c – Artículo 1).

La frecuencia de 3,5 MHz, mostraba la capa externa de la pared del pezón como una línea blanca con un gran espesor, mientras que el borde de las paredes no estaba claramente delimitado con respecto a la cisterna del pezón (Figura 2e, Artículo 1; 2d, Artículo 2).

En ovejas y cabras el espesor de la pared del pezón (TWT), área de la pared del pezón (TWA) y área de la punta del pezón (TEWA), no mostraron diferencias significativas entre las frecuencias de 5 y 7,5 MHz, en los valores antes, después del ordeño ni en la diferencias (después – antes) (Tabla 1 – Artículos 1 y 2).

En ganado caprino, con la frecuencia de 10 MHz, el TWT, TWA y TEWA antes y después del ordeño fue menor comparado con las frecuencias de 5 y 7,5 MHz (tabla 1 – Artículo 1).

Los valores de TWT, TWA y TEWA obtenidos con la frecuencia de 3,5 MHz, fueron significativamente mayores ( $P < 0,001$ ) que los obtenidos con la frecuencia de 5 MHz, tanto antes como después del ordeño en ovejas y cabras (Tabla 1 – Artículos 1 y 2). Como se ha comentado anteriormente, en el caso de la sonda de 3,5 MHz, la capa externa de la pared del pezón se mostró como una línea blanca con un gran espesor, lo que podría explicar los mayores valores con respecto a la frecuencia de 5 MHz.

Franz et al. (2001) indican que en pequeños rumiantes la frecuencia más recomendada es la de 8,5 MHz. Sin embargo, utilizando una frecuencia de 5 MHz en ganado caprino, Bruckmaier y Blum (1992) visualizaron las estructuras internas de la glándula mamaria y Fasulkov et al. (2010) consiguieron visualizar las características del pezón y de la glándula mamaria. En ganado vacuno, con la misma frecuencia, se ha podido observar con claridad las capas de las paredes y cisterna del pezón (Cartee et al., 1986) y también se ha podido medir la longitud y espesor del canal del pezón (Ambord y Bruckmaier, 2010; Weiss et al., 2004).

Con los resultados obtenidos en este experimento, las frecuencias de 5 y 7,5 MHz serían las más adecuadas para estimar los cambios producidos en las paredes del pezón por el ordeño mecánico en ovejas de raza Manchega y cabras Murciano-Granadinas. Además, teniendo en cuenta que en condiciones de campo, la detección de gestación en pequeños rumiantes se realiza por vía transabdominal, siendo la frecuencia de 5 MHz, una de las más utilizadas para la detección de gestación, el uso de esta frecuencia en la exploración de pezones permite disminuir los costes de inversión en equipos.

### **5.1.3. Efecto del operario**

La experiencia del operario no tuvo un efecto en TWT ni TWA en la realización de las exploraciones ecográficas. Esto podría deberse a que las exploraciones eran grabadas en vídeo, por lo que se disponía de muchas imágenes del mismo pezón para poder ser seleccionadas posteriormente por los operarios para su procesado. De esta forma, aunque el operario no tuviese experiencia, había muchas posibilidades de conseguir una buena imagen de cada pezón.

Por otro lado, si se observó un efecto del operario en la medición y elección de la imagen ecográfica (E4 en Artículos 1 y 2) y la medición de las variables sobre las imágenes ecográficas (E5 Artículos 1 y 2). Se observó que el operario con menor experiencia (OP2, Artículos 1 y 2) subestimó los valores antes y después del ordeño en ovejas y cabras (Experimento, E5). Aunque no se puede explicar este patrón, este coincide con lo encontrado por Ślórsarz et al. (2010), en donde el operario con menor experiencia subestimó los valores de espesor de la pared del pezón y la longitud y diámetro del canal del pezón.

### **5.1.4. Aplicación de la misma técnica de ecografía en ganado vacuno y comparación de la ecografía con el cutímetro.**

#### Ecografía en vacas.

Con la misma técnica y equipos utilizado en las ecografías de cabras, se han obtenido valores similares de TWT y longitud del canal del pezón (TCL) que los reportados por diversos autores (Naumann y Fahr, 2000; Neijenhuis et al., 2001;



Gleeson et al., 2002; Weiss et al., 2004; Klein et al., 2005; Ambord y Bruckmaier, 2010). Además, en todas las ecografías realizadas en las vacas Holstein, se pudo observar el canal del pezón como una línea blanca delgada en medio de dos líneas negras-grises delgadas, tal y como lo describe Franz et al. (2001). Estos resultados permitieron validar el método al comprobar que los resultados obtenidos coincidían con los publicados por distintos autores en ganado vacuno.

#### Cutímetro.

En ovejas de raza Manchega y cabras Murciano-Granadinas, el TWT (suma de ambas paredes) medido en imágenes ecográficas, antes y después del ordeño, es mayor que el espesor del pezón (TT) medido con cutímetro (0,69 vs 0,43 cm en cabras; 0,76 vs 0,58 cm en ovejas y 0,86 vs 0,45 cm en cabras; 1,00 vs 0,52 cm en ovejas, antes y después del ordeño, respectivamente). Cabe mencionar que el ordeño mecánico produjo una disminución del TT en ovejas, sin embargo, el TWT, TWA y TEWA medido con ecografía aumentó después del ordeño. Estas diferencias se deben a que el incremento de espesor del pezón tras el ordeño mecánico, estimado mediante el cutímetro, se debe, casi exclusivamente, a la edematización del pezón producida durante el ordeño, ya que la presión ejercida por las placas del aparato fuerza la reevacuación de la sangre acumulada en el pezón disminuyendo, por lo tanto, la congestión que se haya producido (Hamann y Mein, 1990). Con la ecografía, no se ejerce presión sobre el pezón y por lo tanto la sangre acumulada no es reevacuada.

La correlación encontrada entre los valores de espesor de la punta del pezón en la ecografía (TWT) y el cutímetro (TT) ha sido alta y positiva ( $r = 0,69 - 0,62$  en cabras;  $r = 0,65 - 0,38$  en ovejas, antes y después del ordeño respectivamente). Esto concuerda con lo hallado por Ambord y Bruckmaier (2010) que encontraron una  $r = 0,71$  y  $r = 0,85$ , entre el TWT y el espesor del pezón medido con cutímetro, antes y después del ordeño mecánico en ganado vacuno.

### **5.1.5. Uso de la termografía infrarroja como estimador del estado del pezón y comparación con la ecografía.**

#### Temperatura del pezón y de la ubre.

El ordeño mecánico provocó un aumento significativo de la temperatura media en 6,6; 4,9; 2,5 y 1,5 °C en la punta, 1, 2, 3 cm de la punta del pezón, respectivamente. Por otro lado, los valores de temperatura antes y después del ordeño fueron mayores en la ubre que en el pezón. Los valores de temperatura observados en la ubre son similares a los hallados por Barth (2000), Colak et al. (2008) y Polat et al. (2010), en vacuno. La temperatura media del pezón aumentaba conforme se acercaba la lectura a la base del pezón, registrándose la mayor temperatura a 3 cm de la punta del pezón, mientras que la menor temperatura se registraba en la punta del pezón, similar a lo encontrado en ganado vacuno por otros autores (Barth, 2000; Paulrud et al., 2005).

#### Efecto del estado sanitario de la ubre en la temperatura medida mediante termografía infrarroja

En ganado vacuno, diversos autores (Barth, 2000; Hovinen et al., 2008; Polat et al., 2010; Pezeshki et al., 2011) han encontrado un aumento de la temperatura en las glándulas infectadas con respecto a las glándulas sanas. Sin embargo, en cabras Murciano-Granadinas (Artículo 3) no se observaron diferencias significativas entre las glándulas sanas (FREE) e infectadas (INF) en los valores antes ni después del ordeño. Sin embargo, las glándulas FREE presentaron un mayor valor de temperatura en 1 y 2 cm de la punta del pezón que las glándulas con alto recuento de células somáticas debido a causas inespecíficas (UNS). Así mismo, la diferencia de temperatura a 1 cm de la punta del pezón fue menor en las glándulas FREE que en las glándulas INF y UNS.

En la ubre no se apreciaron diferencias significativas en las temperaturas medias antes del ordeño ni en las diferencias entre antes y después del ordeño, sin embargo se observó que después del ordeño las glándulas FREE tenían mayor temperatura media y máxima en la ubre que las glándulas UNS.

### Relación de la termografía infrarroja con la ecografía

Los valores de TWT presentaron una correlación negativa con las temperaturas en la punta y a 1 y 2 cm de la punta del pezón. La mayor correlación negativa entre la temperatura y TWT se encontró a 1 cm de la punta del pezón (TP1 y TA1). Después del ordeño y en las diferencias de temperatura entre antes y después del ordeño no se encontró una correlación significativa con TWT. Tampoco se observó una correlación significativa de TWA y TEWA con las temperaturas observadas en distintos puntos y áreas, tanto antes como después del ordeño.

Al analizar la correlación de los distintos valores en función del estado sanitario (datos no incluidos en los artículos) se comprobó que la correlación significativa observada antes del ordeño con TWT, se debe principalmente a la alta correlación existente en las glándulas UNS ( $r=-0,51$ ) entre TWT y todos los valores de temperatura.

Es posible que el alto RCS hallado en las glándulas UNS no esté relacionado con infecciones intramamarias (Zeng et al., 1997) y se debe a otros factores fisiológicos que provoquen un menor flujo de sangre en el pezón; o que se deba a una infección en los tejidos de la glándula que pueda asociarse con una congestión y edema crónicos de la punta del pezón con lo que el flujo de sangre y la temperatura disminuye (Hovinen et al., 2008).

## **5.2. Efecto de la extracción fisiológica de leche y del ordeño mecánico en las paredes del pezón y tiempo de recuperación a los valores anteriores al ordeño. Artículos 4 y 5.**

### **5.2.1 Objetivos planteados en los artículos 4 y 5.**

El objetivo de este trabajo consistió en estudiar cómo afecta el ordeño mecánico realizado en correctas condiciones al espesor de las paredes y longitud del canal del pezón y su recuperación tras el ordeño a condiciones anteriores al ordeño, en comparación con otros métodos de extracción de leche consideradas de referencia o biológicas: amamantamiento de la cría, extracción de leche mediante cánula y el ordeño manual. Para ello se diseñaron 6 experimentos en cuadrado latino (3 en cabras y 3 en

ovejas), divididos en dos periodos: en el primero la glándula izquierda de todos los animales se ordeñó mecánicamente y en la derecha se aplicó el tratamiento correspondiente. Posteriormente, en el segundo periodo se intercambiaron los métodos de extracción. Durante el periodo experimental se realizaron 4 controles (2 en cada periodo experimental), en donde se realizaron ecografías antes, e inmediatamente después del ordeño a 1, 2, 3, 4, 6, 8 y 10 horas después del final del ordeño.

### **5.2.2 Amamantamiento de la cría vs ordeño mecánico**

El ordeño mecánico provocó en ganado caprino un aumento significativo después del ordeño en TWT, TWA y TEWA comparado con el amamantamiento con cabrito. Esto coincide con lo reportado por Hamann y Mein (1988) en ganado vacuno, en donde el ordeño mecánico produjo mayores valores de espesor de la pared del pezón, medido con cutímetro, que el amamantamiento del ternero. Por el contrario, en ovejas Manchegas no se observaron diferencias significativas entre el ordeño mecánico y el amamantamiento del cordero. Knizkova et al. (2005) indican que el grado de stress que sufre el pezón durante el amamantamiento depende de la edad de la cría y el tiempo de amamantamiento aunque en este trabajo no se observó ningún efecto de la edad de los corderos, ya que durante el periodo 2 del experimento los corderos eran 7 días mayores que durante el periodo 1 y la interacción periodo x tratamiento no tuvo un efecto significativo en las variables.

### **5.2.3 Extracción de leche mediante cánula vs ordeño mecánico**

El ordeño mecánico provocó un aumento de TWT en ganado caprino y ovino ( $P < 0,05$ ) comparado con la extracción de leche con cánula, aunque el incremento de TWT no fue afectado por el tratamiento. En cabras, también se observó un aumento de TWA y TEWA después de la extracción de leche y del incremento de esas variables con el ordeño mecánico. En la extracción de leche con cánula, no se ejerce vacío sobre el pezón, por lo que cabría esperar que no varíe el TWT antes y después de la extracción de leche. Sin embargo, se encontró que el TWT aumento tras la extracción de leche con cánula, aunque en menor medida que el ordeño mecánico. Esto coincide con lo hallado en ganado vacuno por Gleeson et al. (2002) que indican que tras la extracción de leche mediante cánula la presión intramamaria disminuye y los líquidos en la punta del pezón se redistribuyen, lo

que podría explicar el aumento del TWT. Hamann y Mein (1990) indican que en vacuno al drenar la leche vía cánula disminuye la presión intramamaria y se reduce un 3% el TWT medido, lo que indicaría que los cambios en la presión intramamaria tienen poco efecto sobre las medidas de TWT medidos con cutímetro, ya que la presión que ejerce el cutímetro es mayor que la presión intramamaria. Sin embargo, en el caso de la ecografía al no ejercer presión sobre el pezón las medidas sí podrían estar influenciadas por la presión intramamaria.

#### **5.2.4 Ordeño manual vs ordeño mecánico**

Tras la extracción de leche en ovejas y cabras, se observó que en las glándulas ordeñadas mecánicamente, las variables TWT, TWA, TEWA y TCL eran significativamente mayores que en las glándulas ordeñadas manualmente. Sin embargo, sólo en ganado caprino se observó un mayor incremento de las mismas variables con el ordeño mecánico comparado con el ordeño manual. En vacas, el ordeño manual produce menores valores de TWT (Gleeson et al., 2002) debido posiblemente a las diferentes presiones aplicadas sobre el pezón.

#### **5.2.5 Tiempo de recuperación del espesor de las paredes del pezón**

En ganado caprino, el tiempo de recuperación del espesor de la pared (TWT, TWA, TEWA y TCL) a la condición anterior al ordeño fue mayor a las 10 horas en todos los tratamientos ensayados. En ganado ovino, el tiempo de recuperación del pezón varió en función del método de extracción y el mismo método (ordeño mecánico) varió entre las diferentes pruebas. Tras el amamantamiento del cordero, TWT y TWA no se recuperaron dentro de las 10 primeras horas. Sin embargo, TWT y TWA se recuperaron entre 2 y 6 h después de la extracción de leche mediante cánula y ordeño manual. En el caso de TEWA y TCL, los valores se recuperaron inmediatamente después del ordeño manual, y se alargó hasta las 3-4 horas después del amamantamiento y extracción mediante cánula.

En ovejas Manchegas, los mayores valores de TWT, TWA, TEWA y TCL se obtuvieron inmediatamente tras la extracción de leche y disminuyeron a partir de 1 ó 2

horas tras la extracción, en función del método utilizado. En ganado caprino, también se encontró que los mayores valores se obtuvieron después del ordeño a excepción del TWT después del ordeño a mano, en donde los valores siguieron aumentando hasta 1h después de la extracción. Sin embargo, a diferencia del ganado ovino, los valores de las distintas variables no disminuyeron hasta haber transcurrido 4 a 8 horas en función del método de extracción.

En ganado vacuno, Neijenhuis et al. (2001) encontraron que el mayor valor de TWT se obtuvo tras el ordeño y a las 2 horas en el caso de TCL, mientras que Slósz et al. (2010) y Wójtowski et al. (2006) obtuvieron los mayores valores de TWT y TCL a las 4 horas tras el ordeño mecánico.

En ganado vacuno la recuperación del espesor de las paredes del pezón se suele producir entre 4 y 8 horas (Neijenhuis et al., 2001; Gleeson et al., 2002).

### **5.3 Efecto del sobreordeño, tipo, estado y colocación de los manguitos en los tejidos del pezón de cabras Murciano-Granadinas y ovejas Manchegas. Artículo 6.**

#### **5.3.1 Objetivos planteados en el artículo 6**

El objetivo de este artículo consistió en estudiar el efecto en el espesor de la pared y la longitud del canal del pezón en cabras y ovejas del sobreordeño de 2 minutos (OM+2), del ordeño con manguitos usados (AL; +3000 ordeños) y girados (TL; 45°), así como el efecto del ordeño de cabras con manguitos diseñados para ovejas (SL, menor longitud y diámetro que los manguitos de cabras). Para ello se diseñaron 4 experimentos en cabras y 3 en ovejas, en cuadrado latino con 2 periodos experimentales. Durante el periodo experimental se realizaron 4 controles, en donde se realizaron ecografías antes e inmediatamente después del ordeño en las que se determinó el espesor de la pared del pezón (TWT), área de la pared del pezón (TWA), área de la punta del pezón (TEWA) y longitud del canal del pezón (TCL).

### 5.3.2 Efecto del sobreordeño (no sobreordeño vs sobreordeño 2 minutos)

El sobreordeño de 2 minutos en ovejas y cabras aumentó el grado de congestión/edema de la punta del pezón. Por un lado, se observó que, en ganado caprino, el sobreordeño provocó un mayor incremento en TWT, TWA, TEWA y TCL. En el caso del ganado ovino, el sobreordeño produjo un mayor incremento en TWA, TEWA y TCL, pero no en TWT. Esto concuerda con los resultados obtenidos por Isaksson y Lind (1992), Gleeson et al. (2002) y Paulrud et al. (2005) en ganado vacuno. El incremento de espesor puede afectar a los mecanismos de defensa del pezón, aumentando las posibilidades de nuevas infecciones intramamarias (Neijenhuis et al., 2001). Además, durante el sobreordeño, debido al bajo o inexistente flujo de leche, se produce el “*reverse pressure gradient*” que puede introducir bacterias dentro de la cisterna del pezón (Rasmussen et al., 1994). Durante el sobreordeño el nivel de vacío medio en el pezón es mayor debido a que no hay flujo de leche que ayude a disipar el vacío, lo cual si se realiza de forma repetida puede ocasionar daños capilares (Hillerton et al., 2002). Gleeson et al. (2003) indican que un sobreordeño de 5 minutos durante 4 meses produce un mayor daño en la cisterna del pezón y una mayor pérdida de queratina que un ordeño con retirada automática (0,2 kg/min).

### 5.3.3 Efecto del estado de los manguitos (nuevos vs +3000 ordeños)

El uso de manguitos con más de 3000 ordeños provocó un mayor incremento de TWT en cabras y ovejas. Además, en ganado caprino también se observó un mayor incremento del TCL después del ordeño con manguitos usados (+3000 ordeños). Estos resultados están en concordancia con lo descrito por Boast et al. (2008) en vacuno, que indican que el uso de manguitos usados (+5000 ordeños) produce efectos en los pezones similares a los producidos cuando falla la pulsación. Esto puede ser debido a dos diferentes motivos. El primero está asociado con la reducción de la tensión de montaje de los manguitos con el uso, lo que hace disminuir la compresión del manguito aplicada al pezón (Mein et al., 2003). En este trabajo se ha encontrado un 3% de aumento en la longitud del manguito, porcentaje menor a lo reportado por otros autores (Davis et al., 2000; Boast et al., 2008), por lo que es posible que esta elongación no haya afectado en gran medida a la tensión de montaje del manguito. El segundo motivo se basa en que

cuando los manguitos se encuentran cerca del final de su vida útil, la forma del cuerpo se torna ligeramente ovalada, lo cual reduce la resistencia al colapso de las paredes disminuyendo el punto de colapso de las paredes de los manguitos (PCM). En este experimento, el PCM de los manguitos usados fue menor que el de los manguitos nuevos, lo que podría indicar que durante el ordeño se aplicó una compresión mayor al óptimo afectando a los tejidos del pezón. Aunque el fabricante indica que el PCM no es un buen indicador del desgaste del manguito de silicona debido a que no cambia con el uso (Gea Farm Technologies, Bonen, 2010). Es importante destacar que el fabricante recomienda cambiar los manguitos a las 1500 horas de trabajo o en todo caso, cada año. Aunque, los manguitos utilizados en este experimento se encontraban cerca del final de la vida útil (cercano a 1500 h y más de 3000 ordeños), si tenían más de 1 año y medio de uso, lo que ha podido provocar un empeoramiento de sus propiedades físicas y químicas pudiendo producir alteraciones en la dinámica de fluidos a nivel de los tejidos de la punta y paredes del pezón.

#### **5.3.4 Efecto de la colocación de los manguitos (normal vs girados 45°)**

El ordeño con manguitos girados ha producido mayores incrementos de TWT y TCL en ganado caprino y una mayor diferencia (medidas después – antes del ordeño) en TEWA y TCL. El mal posicionamiento de los manguitos puede ser debido a la disminución de la tensión a lo largo del tiempo, por lo que es importante realizar revisiones periódicas de la colocación de los manguitos para evitarlo. Los manguitos girados dificultan el movimiento de las paredes del manguito debido a la propia torsión del manguito, lo cual puede aumentar la tensión de las paredes y afectar el colapso de los manguitos sobre la punta del pezón.

#### **5.3.4 Efecto del ordeño de cabras con manguitos diseñados para ovejas**

El ordeño de cabras con pezoneras de ovejas produjo un mayor aumento en TWT, TWA, TEWA y TCL después del ordeño, encontrándose además, diferencias significativas en los incrementos de las variables registradas después del ordeño respecto a sus valores iniciales. Estos resultados corroboran las recomendaciones de Mein et al. (2003) al indicar la importancia de elegir el manguito correcto para cada



especie puesto que el diseño del manguito tiene un mayor efecto sobre las características del ordeño que cualquier otro factor de la máquina de ordeño. Para que la pulsación sea efectiva y se pueda aplicar la carga compresiva a los tejidos del pezón, el manguito debería ser capaz de colapsarse totalmente debajo del pezón. Para ello, el cuerpo del manguito debe ser 25 mm más largo que el pezón en esta etapa, sobre todo, si se considera que al inicio del ordeño los pezones de vacuno se alargan alrededor de 40-50% (Mein, 1992). Si se extrapolan esos datos a las condiciones de este trabajo, se puede apreciar que el manguito de ovejas no tendría una longitud de cuerpo suficiente para el ordeño de pezones de más de 48 mm ( $93 \text{ mm} - 25 \text{ mm} = 68 \text{ mm}$ ;  $68 \text{ mm} / 40-50\% = 45 - 48 \text{ mm}$ ; ver Tabla 1 - Artículo 6). En este trabajo, cerca del 21% de los pezones sobrepasan la longitud de 48 mm y más del 42% sobrepasan la longitud de 45 mm (datos no incluidos en los artículos). Por lo tanto, el manguito de ovejas no realizaría correctamente el masaje sobre la punta de pezón en un porcentaje alto de cabras.







## ***6. CONCLUSIONES***



## Conclusiones generales

El uso de la técnica de ultrasonidos es una herramienta útil para estimar la variación de espesor de las paredes del pezón en cabras Murciano-Granadinas y ovejas Manchegas debido al ordeño mecánico. En la práctica, esta técnica puede ser utilizada a nivel de granja para la evaluación rutinaria de la condición del pezón y los efectos negativos que el ordeño mecánico pueda producir, lo cual permitiría, a su vez alertar sobre la necesidad de un control de funcionamiento de la máquina de ordeño en caso de encontrar daños en el pezón. Además, puede ser una herramienta muy útil para las casas fabricantes de máquinas de ordeño para el estudio de los parámetros de ordeño y/o en el desarrollo de componentes de ordeño específicos para pequeños rumiantes.

Las principales conclusiones obtenidas de los resultados recogidos en los seis artículos incluidos en esta Tesis Doctoral son las siguientes:

1. Las frecuencias de exploración más adecuadas para la realización de ecografías del pezón en cabras Murciano-Granadinas y ovejas Manchegas son 5 y 7,5 MHz.
2. Es necesario desarrollar herramientas informáticas (software) que permitan automatizar la elección y medición de las imágenes ecográficas para reducir el efecto subjetivo del operador que realiza esas operaciones.
3. La termografía infrarroja permite detectar cambios en la temperatura de pezón en ganado caprino debidos al ordeño mecánico. El área o punto más adecuado para determinar estos cambios se sitúa a 3 cm de la punta del pezón, puesto que esta área no fue afectada por el estatus sanitario del animal.
4. En ganado caprino y ovino, el ordeño mecánico y otros métodos considerados fisiológicos (amamantamiento de la cría, extracción de leche por gravedad mediante cánula y ordeño manual) producen un aumento de TWT, TWA, TEWA y TCL comparado con los valores antes de la extracción de leche. En el caso del ganado caprino el incremento de estas variables es mayor con el ordeño mecánico realizado en perfectas condiciones que con los métodos fisiológicos, aunque, sería necesario realizar otros estudios para determinar si esos cambios

son suficientes como para que se vea afectado el estado sanitario de la glándula mamaria.

5. En cabras Murciano-Granadinas el tiempo de recuperación del pezón a sus valores iniciales tras la extracción de leche es mayor a las 10 horas. En la práctica indicaría que éste es el tiempo mínimo adecuado para realizar un segundo ordeño.
6. En ovejas Manchegas el tiempo de recuperación del pezón a sus valores iniciales tras la extracción de leche varió dependiendo del método de extracción, desde 1 hora después del ordeño manual hasta más de 10 horas en el caso del amamantamiento del cordero. En el caso del ordeño mecánico fue de 2 hasta 10 horas dependiendo de la variable medida y del experimento, indicando que en la práctica este sería el tiempo entre ordeños mínimo adecuado.
7. El sobreordeño de 2 minutos, el ordeño con manguitos con más de 3000 ordeños, y el ordeño con manguitos mal colocados (girados 45° sobre su propio eje) en ganado caprino y ovino produjo congestión/edema de los tejidos del pezón lo que podría afectar los mecanismos de defensa del pezón. Además, las cabras Murciano-Granadinas ordeñadas con pezoneras diseñadas para ganado ovino sufren un mayor incremento de las paredes del pezón.



## ***7. BIBLIOGRAFÍA***





Alacam, D., Dinc, A., Guler, M. y Elma, E., 1990. Incidence and radiographic examination of different pathological findings in the teat of dairy cows. *Deutsche Tierärztliche Wochenschrift*, 97: 523–525.

Ambord, S. y Bruckmaier, R.M., 2010. Milk flow-dependent vacuum loss in high-line milking systems: effects on milking characteristics and teat tissue condition. *J. Dairy Sci.* 93: 3588–3594.

Ayadi, M., Caja, G., Such, X. y Knight, C.H., 2003. Use of ultrasonography to estimate cistern size and milk storage at different milking intervals in the udder of dairy cows. *J. Dairy Res.*, 70: 1-7.

Babkine, M y Couture, Y., 2002. Echography applied to the cow's teat is a valuable non-invasive diagnostic tool. (L'échographie du trayon est un outil diagnostique non invasif). *Point-Veterinaire*. 33, 225: 16-17.

Balageas, D.J., 2007. Termografía infrarroja: una técnica multifacética para la evaluación no destructiva (END). IV Conferencia Panamericana de END, Buenos Aires, Octubre.

Barth, K., 2000. Basic investigations to evaluate a highly sensitive infrared-thermograph-technique to detect udder inflammation in cows. *Milchwissenschaft-Milk-Science International*. 55: 607 – 609.

Billon, P., Marnet, P.G., Dano, Y. y Aubrij, J.M., 2000. Influence de differents parametres de pulsation sur la traite de chevres laitieres. Institut de l'Élevage. *Compte rendu 1002*: 103-118.

Billon, P., Marnet, P., Aubry, J.M., Dano, Y. y Maugras, J., 2005. Influence of Pulsation parameters on Milking and udder health of Dairy Goats. Physiological and Technical Aspects of Machine Milking Proceedings of the International Conference held in Nitra, Slovak Republic, 26 - 28 April. Editors: V. Tancin, S. Mihina & M. Uhrincat. pp 137-146.

Blowey, R. y Edmondson, P., 1995. Control de la mastitis en granjas de vacuno de leche. Ed. Acribia, 208 pp.

Boast, D., hale, M., Bennett, M. y Hillerton, J.E., 2003. The milking liner. Proceedings of the British Mastitis Conference, Garstang. 35-43.

Boast, D., Hale, M., Turner, M. y Hillerton, J.E., 2008. Variation in rubber chemistry and dynamic mechanical properties of the milking liner barrel with age. J. Dairy Sci. 91: 2247-2256.

Britt, J.S. y Farnsworth, R., 1996. A system for evaluating teat anatomy, skin condition and teat ends. Proc. 35th Annual Meeting, National Mastitis Council, Nashville, TN.

Bruckmaier, R.M. y Blum, J.M., 1992. B-mode ultrasonography of mammary glands of cows, goats and sheep during  $\alpha$ - and  $\beta$ -adrenergic agonist and oxytocin administration. J. Dairy Res. 59: 151-159.

Callejo, A., 1996. La rutina de ordeño en el ganado caprino. Zootecnia. Bases de la producción animal. Tomo IX: Producción caprina. Ed. Mundi-Prensa. 179-190.

Capote, J., castro, N., Caja, G., Fernández, G., Briggs, H., y Argüello, A. 2008. Effects of the frequency of milking and lactation stage on milk fractions and milk composition in Tinerfeña dairy goats. *Small Ruminant Res.* 75: 252-255.

Capuco, A.V., Mein, G.A., Nickerson, S.C., Jack, L.J.W., Wood, D.L., Bright, S.A., Aschenbrenner, R.A., Miller, R.H. y Bitman, J., 1994. Influence of pulsationless milking on teat canal keratin and mastitis. *J. dairy Sci.* 77, 1: 64-74

Cartee, R.E., Ibrahim, A.K. y McLeary, D., 1986. B-Mode ultrasonography of the bovine udder and teat. *JAVMA.* 188: 1284–1287.

Casirani, G., Binda, E., Piccinini, R. y Zecconi, A., 2002. Practical approach to the evaluation of teat tissues conditions in commercial Dairy herds. XXII World Buiatric Congress, Hannover 18-23, 346-359.

Castillo, V., Such, X., Caja, G., Casals, R., Albanell, E. y Salama, A.A., 2008. Effect of milking interval on milk secretion and mammary tight junction permeability in dairy ewes. *J. Dairy Sci.* 91: 2610–2619.

Castro-Costa, A., Caja, G., Salama, A.A., Rovai, M., Flores, C. y Aguiló, J. 2014. Thermographic variation of the udder of Dairy ewes in early lactation and following an *Escherichia coli* endotoxin intramammary challenge in late lactation. *J. Dairy Sci.* 97: 1377-1387.

Celik, H.A., Aydin, I., Colak, M., Sendag, S. y Dinc, D.A., 2008. Ultrasonographic evaluation of age related influence on the teat canal and effect of this influence on milk yield in brown swiss cows. *Bull. Vet. Inst. Pulawy* 52: 245-249.

Colak, A., Polat, B., Okumus, Z., Kaya, M., Yanmaz, L. y Hayirli, A., 2008. Early detection of mastitis using infrared thermography in dairy Cows. *J. Dairy Sci.* 91: 4244–4248.

Davis, M., Reinemann, D. y Mein, G., 2000. Relationships between physical characteristics and milking characteristics of the aging milking liner. Presented at The ASAE Annual International Meeting, Milwaukee Paper 00-3014 ASAE St Joseph MI.

De Domenico, A., Parisi, F., La Spisa, M., Pugliese, M., Niutta, P.P. y De majo, M., 2006. Ecografia del capezzolo mediante immersione in acqua: valutazione nella bovina in lattazione e asciutta. XIV Congreso International de la Federación Mediterránea de Sanidad y Producción de Rumiantes. Lugo, 12-15 Julio. 309-316.

Díaz, J.R., Peris, C. y Fernández, N., 2004. Efectos del ordeño mecánico en el estado del pezón. *Bovis*, 118.

Dinç, D.A., Sendag, S. y Aydin, I., 2000. Diagnosis of teat stenosis in dairy cattle by real- time ultrasonography. *The Veterinary Record*; 147: 270-272.

Eitam, M. y Hamann, J., 1993. Relevance of machine-induced teat tissue reactions in cows for improvement of machine milking in small ruminants. V Symposium International on Machine Milking of Small Ruminants, Budapest, Bulgaria. 401-409.

EUROSTAT 2016. Statistical office of the European Union. (<http://ec.europa.eu/eurostat>) Acceso abril 2016.

Fahr, R., Schulz, J. y Rosner, F., 2001. Milking associated changes of the teat end in goats. [Melkbedingte Veränderungen an der Zitzenspitze der Ziege]. *Tierarztl Prax.* 29(G):151-156.

Fasulkov, I.R., Georgiev, P.I., Antonov, A.L. y Atanasov, A.S., 2010. B-mode ultrasonography of mammary glands in goats during the lactation period. BJVM. 13: 245–251.

Fasulkov, I., Vasilev, N., Karadaev, M. y Dineva, G., 2014. Visualization and measurement of teat structures in Black-and-white cows through ultrasonography. Mac. Vet. Rev. 37, 1: 89-93.

Fernández, N. y Rodríguez M., 1994. La aptitud al ordeño mecánico y sus criterios de valoración. Ovis. 32, 17-27.

Fernández, N., Requena, R., Beltrán, M., Peris, C., Rodríguez, M., Molina, P. y Torres, A., 1997. Comparison of different machine milking clusters on dairy ewes with large size teats. Annales de Zootechnie. 46: 207-218.

Franz, S., Hofmann-Parisot, M., Baumgartner, W., Windischbauer, G., Suchy, A. y Bauder, B., 2001. Ultrasonography of the teat canal in cows and sheep. Vet. Rec. 149: 109-112.

Franz, S., Hofmann-Parisot, M., Gutler, S. y Baumgartner, W., 2003. Clinical and ultrasonographic findings in the mammary gland of sheep. New Zeal. Vet. J. 51: 238-243.

Franz, S., Hofmann-Parisot, M. y Baumgartner, W. 2004. Evaluation of three-dimensional ultrasonography of the bovine mammary gland. Ame. Jour. Vet. Res. 65: 1159-1163.

Franz, S., Floek, M. y Hofmann-Parisot, M., 2009. Ultrasonography of the bovine udder and teat. Vet Clin Food Anim 25: 669–685.

Gayrard, V., Carrière, P.D y DesCôteaux. 2010. Principles and recommendations, essentials Concepts, and common artifacts in ultrasound imaging. En: Practical Atlas of Ruminant and Camelid Reproductive Ultrasonography. Ed. Wiley Blackwell. pp 246.

Giesecke, W.H., Gerneke, W.H. y Van Rensburg, I.B.K., 1972. The morphology of the bovine teat canal. *J. South African Vet. Association.* 43:351-354.

Gleeson, D.E. y O'Callaghan, E.J., 1998. A note on the effect of ageing on teatcup liner performance. *Irish J. Agri. F. Res.* 37: 93-95.

Gleeson, D.E., O'Callaghan, E.J. y Rath, M.V., 2002. Effect of milking on bovine teat tissue as measured by ultrasonography. *Irish Vet. J.* 55: 628-632.

Gleeson, D.E., O'Callaghan, E.J. y Rath, M.V., 2003. Effect of vacuum level on bovine teat-tissue and milking characteristics. *Irish Vet. J.* 42: 205-211.

Gleeson, D.E., O'Callaghan, E.J. y Rath, M.V., 2004. Effect of liner desing, pulsator setting, and vacuum level on bovine teat tissue changes and milking charascteristics measured by ultrasonography. *Irish Vet. J.* 57: 289-296.

Goddard, P.J., 2000. *Ecografía Veterinaria*. Ed. Acribia, Zaragoza, España, pp. 400.

Goldberg, J.J., Murdoch, P.A., Howard, A.B., Drechsler, P.A. y Pankey, J.W., 1994. Winter evaluation of a postmilking powdered teat dip. *J. Dairy Sci.* 77: 748-758.

González de Bulnes, A.; Santiago, J.; López, A., 1999. Principios básicos de ultrasonografía. En: *Ecografía aplicada al control de la reproducción en ovino y caprino*. *Ovis* 61:13-19.

González-Escalada, J.R., de la Calle, J.L. y Perucho, A., 1999. Flujometría campimétrica por láser doppler. Un nuevo procedimiento diagnóstico y evaluativo del dolor. *Rev. Soc. Esp. Dolor.* 6: 187-198.

González-romano, N., Arencibia, A., Espinosa de los Monteros, A., Rodríguez, E., Rivero, M., Vázquez, J.M., Capote, J. y Jaber, J.R., 2000. Anatomical evaluation of

the caprine mammary gland by computed tomography, radiology and histology. *Anat. Histol. Embryol.* 29: 25-30.

Haenlein, G.F.W. y Caccese, R., 1992. The udder. En: *Goat extension handbook*. ([http://outlands.tripod.com/farm/national\\_goat\\_handbook.pdf](http://outlands.tripod.com/farm/national_goat_handbook.pdf)) Acceso marzo 2016.

Hamann, J. 1990. Effect on machine milking on teat end condition with special emphasis on infection risk. *World Rev. Animal Production* XXV, 1: 9-11.

Hamann, J. y Burvenich, C., 1994a. Physiological status of the bovine teat. En: *Teat Tissue reactions to machine milking and new infection risk*. *IDF Bulletin*, 297: 3-12.

Hamann, J. y Burvenich, C., 1994b. Appendix: glossary of terms. En: *Teat Tissue reactions to machine milking and new infection risk*. *IDF Bulletin*, 297: 42-43.

Hamann, J. y Dück, M., 1984. Preliminary report on measurement of teat skin temperature using infrared thermography. *Milchpraxis*, 22, 4: 148-152.

Hamann, J. y Osteras, O., 1994. II Special aspects En: *Teat Tissue reactions to machine milking and new infection risk*. *IDF Bulletin*, 297: 35-41.

Hamann, J., Burvenich, C., Mayntz, M., Osteras, O. y Haider, W., 1994a. Machine-induced changes in the status of the bovine teat with respect to the new infection risk. En: *Teat Tissue reactions to machine milking and new infection risk*. *IDF Bulletin*, 297: 13-22.

Hamann, J., Osteras, O., Mayntz, M. y Woyke W., 1994b. Functional parameters of milking units with regard to teat tissue treatment. En: *Teat Tissue reactions to machine milking and new infection risk*. *IDF Bulletin*, 297: 23-34.

Hamann, J. y Mein, G.A., 1988. Responses of bovine teat to machine milking. Measurement of changes in thickness of the teat apex. *J. Dairy Res.*, 55: 331-338.

Hamann, J. y Mein, G.A., 1990. Measurement of machine-induced changes in thickness of the bovine teat. *J. Dairy Res.*, 57: 495-505.

Hamann, J. y Mein, G.A., 1996. Teat thickness changes may provide biological test for effective pulsation. *J. Dairy Res.*, 63: 179-189.

Hamann, J., Mein, G.A. y Wetzell, S., 1993. Teat tissue reactions to milking: Effects of vacuum level. *J. Dairy Sci.*, 76: 1040-1046.

Hamann, J., Mein, G.A. y Nipp, B., 1996. Recommended method for measuring changes in thickness of the bovine teat with spring-loaded calipers. *J. Dairy Res.*, 63: 309-313.

Harper, D.L., 2000. The value of infrared thermography in the diagnosis and prognosis of injuries in animals. In: *Proceedings of. Inframation. Orlando, USA*, 115 – 122.

Head, M.J. y Dyson, S., 2001. Talking the temperature of equine thermography. *Vet. J.* 162:166–167.

Henderson, A.J. y Peaker, M., 1987. Effects of removing milk from the mammary ducts and alveoli, or of diluting stored milk, on the rate of milk secretion in the goat. *Quaterly. J. Experimental Physiol.* 72: 13-19.

Hillerton, J.E., Ohnstad, I., Baines, J.R. y Leach, K.A., 2000 Changes in cow teat tissue created by two types of milking cluster. *J. Dairy Res.* 67: 309-317.



Hillerton, E., Pankey, J. y Pankey, P., 2002. Effect of over-milking on teat condition. *J. Dairy Res.* 69:81-84.

Hillerton, J.E., Boast, D., Middleton, N. y Ohnstad, I., 2004. Changes in milking liner performance with age. In: *100 Years with Liners and Pulsators in Machine Milking*. IDF Bulletin No 388, International Dairy Federation, Brussels, Belgium 35–40

Hospes, R., Seeh, C., 2000. *Ecografía y endoscopía de la ubre de la vaca. Principios fundamentales*. Boehringer Ingelheim. Ed. Temis Pharma SL. Barcelona. Vol. 1. 47 pp.

Hovinen, M., Siivonen, J., Taponen, S., Hänninen, L., Pastell, M., Aisla, A. y Pyörälä, S., 2008. Detection of clinical mastitis with the help of a thermal camera. *J. Dairy Sci.* 91: 4592–4598.

Hurnik, J.F., Webster, A.B., y De Boer, S., 1985. An investigation of skin temperature differentials in relation to estrus in dairy cattle using a thermal infrared scanning technique. *J. Animal Sci.* 61: 1095-1102.

Hussein, H.A., Westphal, A., y Staufenbiel, R. 2013. Relationship between body condition score and ultrasound measurement of backfat thickness in multiparous Holstein dairy cows at different production phases. *Aust. Vet. J.* 91: 185-189.

IDF (International Dairy Federation), 2006. Continuous monitoring of machine milking. *Bulletin of the international Dairy Federations.* 1- 30.

Isaksson, A. y Lind, O., 1992. Teat reactions in cows associated with machine milking. *J. Vet. Medecine,* 39: 282-288.

Isaksson, A., Lind, O., 1994. Milking related changes in the surface temperature of the bovine teat skin. *Acta Vet. Scand.* 35: 435–438.

Jankus, E.F. y Baumann, L.E., 1986. Blood flow to the distal part of the teat (mammary papilla) of lactating cows. *Am. J. Vet. Res.* 47: 283-285.

Jenninger, S., 1989. *Ultraschalluntersuchungen an der milchdrüse des Rindes. Physiologische und pathologische befunde.* München, Germany 1989, pp 99.

Klein, D., Flock, M., Khol, J., Franz, S., Stuger, H. y Baumgartner, W., 2005. Ultrasonographic measurement of the bovine teat: breed differences, and the significance of the measurements for udder health. *J. Dairy Res.* 72: 296-302.

Knizkova, I., Kunc, P., Broucek, J. y Kisac, P., 2005. The effect of calf suckling and machine milking on bovine teats. *Physiological and Technical Aspects of Machine Milking Proceedings of the International Conference held in Nitra, Slovak Republic, 26 - 28 April* Editors Tancin V, Mihina S & Uhrincat M. 137-146

Kubicek, J., 1972. The radiographical view of the bovine teat. Attribution to physical findings in the teat of dairy cows. *Tierärztliche Umschau*, 27: 119–124.

Lacy-Hulbert, S.J. y Hillerton, J.E., 1995. Physical characteristics of the bovine teat canal and their influence on susceptibility to streptococcal infection. *J. Dairy Res.*, 62: 395-404.

Lahiri, B.B., Bagavathiappan, S., Jayakumar, T. y Philip, J., 2012. Medical applications of infrared thermography: A review. *Infrared Physics & Technology.* 55: 221-235.

Laue, H.J., y Petersen, U., 1991. Relations between temperature changes in the rumen and roughage intake of dairy cows. *Zuchtungskunde* 63:282–293.

Le Du, J. y Benmederbel, B., 1984. Aptitude des chèvres de race Saanen à la traite mécanique. Relations avec les caractéristiques physiques du trayon. *Ann. Zootech.*, 33: 375-384.

Le Du, J., 1989. La traite mécanique des chèvres. *INRA. Prod. Anim.*, 2, 1:,31-38.

Lele, P.P., 1979. Safety and potential hazards in the current applications of ultrasound in ostetrics and gynecology. *Ultrasound Med. Biol.* 5: 307-320.

Luiz, C.R. y Miglino, M.A., 2000. Vascularização arterial da glândula mamária em caprinos sem raça definida (*Capra hircus*, Linnaeus, 1758). *Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.* Vol.37 n.1. [http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S1413-95962000000100001&script=sci\\_arttext](http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S1413-95962000000100001&script=sci_arttext) Acceso marzo 2016.

Lunstra, D.D., y Coulter, G.H., 1997. Relationship between scrotal infrared temperature patterns and natural-mating fertility in beef bulls. *J. Anim. Sci.* 75:767–774.

MAGRAMA 2016. Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente. <http://www.magrama.gob.es/es/> Acceso abril 2016.

Mahdi, A. 2009. Anatomical, histological and radiological study of the mammary gland of small ruminants. *Bas. J. Vet. Res.* 8: 10-22.

Manzur, A. Díaz, J.R., Mehdid, A., Fernández, N. y Peris, C. 2012. Effect of mid-line or low-line milking systems on milking characteristics in goats. *J. Dairy Res.*, 79: 375-382.

Mavrogianni, V.S., Fthenakis, G.C., Burriel, A.R., Gouletsou, P., Papaioannou, N. y Taitzoglou, I.A., 2004. Experimentally Induced Teat Stenosis in Dairy Ewes: Clinical, Pathological and Ultrasonographic Features. *J. Comp. Path.* 130: 70–74.

McDonald, J.S. y Witzel. D.A., 1966. Differential pressures across the bovine teat canal during three methods of milk removal. *J. Dairy Sci.* 49: 176-178.

McDonald, J.S., 1975. Radiographic method for anatomic study of the teat canal; changes between milking periods. *Am. J. Vet. Res.* 36: 1241–1242.

Mein, G.A., 1992. Action of the cluster during milking. En: *Machine Milking and Lactation*. Ed. Insight Books, USA, 97-140.

Mein, G.A., Neijenhuis, F., Morgan, W.F., Reinemann, D.J., Hilleron, J.E., Baines, J.R., Ohnstad, I., Rasmussen, M.D., Timms, L., Britt, J.S., Farnsworth, R., Cook, N. y Hemling, T., 2001. Evaluation of bovine teat condition in commercial dairy herds: 1. Non-infectious factors. *AABP-NMC International Symposium on Mastitis and Milk Quality in Vancouver, BC, Canada.* 347-351.

Mein, G.A., Williams, D.M.D. y Reinemann, D.J., 2003. Effects of milking on teat-end hyperkeratosis: 1. Mechanical forces applied by the teatcup liner and responses of the teat. In *National Mastitis Council Regional Meetings Proceedings*, pp. 114–123. Fort Worth, TX, Madison, WI: National Mastitis Council.

Mein, G. A., Reinemann, D.J., O’Callaghan, E. y Ohnstad, I., 2004. Where the rubber meets the teat and what happens to milking characteristics. *Bull. Int. Dairy Fed.* No. 388/2004. Pages 28–34 in *Proc. IDF World Dairy Summit 2003: 100 Years with Liners and Pulsators in Machine Milking*. Int. Dairy Fed./Fed. Int. Laiterie, Brussels, Belgium.

Mein, G.A. y Reinemann D.J., 2009 Biomechanics of milking: teat – liner interactions. Paper number 09743 presented at The 2009 ASABE Annual International Meeting, Reno, Nevada. ASABE St Joseph MI

MERCASA, 2015. Alimentación en España ([http://www.mercasa-ediciones.es/alimentacion\\_2015/3\\_info\\_sectores.html](http://www.mercasa-ediciones.es/alimentacion_2015/3_info_sectores.html)). Acceso marzo 2016.

Molina, A., Fernández, C., Vergara, H. y Gallego, L., 1999. Efecto del sobreordeño sobre la producción de Leche y estado sanitario de la ubre en ovejas de raza Machega. *Arch. Zootec.* 48:147–156.

Natzke, R.P., Everett, R.W. y Bray, D.R., 1982. Effect of overmilking on udder health. *J. Dairy Sci.*, 65: 117-125.

Naumann, I. y Fahr, R., 2000. Investigations of milk flow from udder quarters [Untersuchungen zum Milchfluss aus Eutervierteln] *Arch. Tierz.* 43, 5: 431-440.

Neijenhuis, F., Barkema, H.W., Hogeveen, H. y Noordhuizen, J.P.T.M., 2000. Classification and Longitudinal Examination of Callused Teat Ends in Dairy Cows. *J. Dairy Sci.*; 83: 2795-2804.

Neijenhuis, F., Klungel, G.H. y Hogeveen, H., 2001. Recovery of cow teats after milking as determined by ultrasonography scanning. *J. Dairy Sci.*, 84: 12, 2599-2606.

Nikkhah, A., Plaizier, J.C., Einarson, M.S., Berry, R.J., Scott, S.L. y Kennedy, A.D., 2005. Infrared thermography and visual examination of hooves of dairy cows in two stages of lactation. *J. Dairy Sci.* 88:2749–2753.

NMC (National Mastitis Council), 1998. Simple checks of a milking system. (<http://www.nmconline.org/articles/simplechks.htm>) Acceso marzo 2016

Nyland, T., Mattoon, J., Herrgesell, E. y Wisner, E., 2002. Physical principles, instrumentation, and safety of diagnostic ultrasound. In: Nyland, T., Matton, J. (Eds.), *Small Animal Diagnostic Ultrasound*, second edition. Saunders, 461 pp.

O'Callaghan, E.J., 2001. Influence of liner design on interactions of the teat and liner. *Irish J. Agricultural and Food Res.* 40: 169-176.

Ohnstad, I., Mein, G.A., Baines, J.R., Rasmussen, M.D., Farnsworth, R., Pocknee, B.R, Hemling, T.C. y Hillerton, B.R., 2007. Addressing teat conditions problems. NMC Annual Meeting Proceedings. San Antonio, Texas, January 21<sup>st</sup>- 24<sup>th</sup>. 188-199.

O'Shea, J., 1987. Machine milking factors affecting mastitis. A literature review. En: Machine milking and mastitis. IDF, 215: 5-28.

O'Shea, J., O'Callaghan, E. y Walsh, J.P., 1984. Machine milking Research. En: Moorepark 25th Anniversary Publication. Part II: Animal Health and Machine Milking. An Foras Talúntais, Dublin, 115-214.

Pařilová, M., Stádník, L., Jeřkova, A. y Štolc, L., 2011. Effect of milking vacuum level and overmilking on cows' teat characteristics. Acta universitatis agriculturae et silviculturae mendelianae brunensis LIX 193-202.

Paulrud, C. 2005. Basic concepts of the bovine teat canal. Veterinary Research Communications, 29: 215-245.

Paulrud, C., Clausen, S., Andersen, P.E. y Rasmussen, M.D., 2005. Infrared thermography and ultrasonography to indirectly monitor the influence of liner type and overmilking on teat tissue recovery. Acta Vet. Scand. 46:137-147.

Peris, S., Caja, G. y Such, X., 1999. Relationships between udder and milking traits in Murciano-Granadina dairy goats. Small Rumin. Res. 33: 171-179.

Peris, C., Díaz, J.R., Segura, C., Martí, A. y Fernández, N., 2003a. Influence of pulsation rate on udder health and teat thickness changes in dairy ewes. J. Dairy Sci. 86, 2: 1-7.

Peris, C., Díaz, J.R., Balasch, S., Beltrán M.C., Molina, M.P. y Fernández, N., 2003b. Influence of vacuum level and overmilking on udder health and teat thickness changes in Dairy ewes. J. Dairy Sci. 86: 3891-3898.

Persson, K., 1991. Microcirculation in the bovine teat skin, measured by Laser Doppler flowmetry. *Acta Vet. Scand*, 32: 131-133.

Peteers, G., Coussens, R. y Sierens, G., 1949. Physiology of the nerves in the bovine mammary gland. *Arch. Int. Pharmacodyn. Ther.* 79: 75-82.

Pezeshki, A., Stordeur, P., Wallemacq, H., Schynts, F., Stevens, M., Boutet, P., Peelman, L., Spiegeleer, B., Duchateau, L., Bureau, F., Burvenich, C., 2011. Variation of inflammatory dynamics and mediators in primiparous cows after intramammary challenge with *Escherichia coli*. *Vet. Res.*, 42:15.

Piccione, G., Arcigli, A., Assenza, A., Percipalle, M. y Caola, G., 1994. Pulsed wave-doppler ultrasonographic evaluation of the mammary blood flow in the ewe. *Acta Vet. Brno*, 73: 23. 27.

Polat, B., Colak, A., Cengiz, M., Yanmaz, L.E., Oral, H., Bastan, A., Kaya, S. y Hayirli, A., 2010. Sensitivity and specificity of infrared thermography in detection of subclinical mastitis in dairy cows. *J. Dairy Sci.* 93, 8: 3525-32.

Rasmussen, M.D. y Mayntz, M., 1998. Pressure in the teat cistern and the mouth of the calf during suckling. *J. Dairy Res.* 65: 685-692.

Rasmussen, M.D., 2004. Overmilking and teat condition. National Mastitis Council, Annual Meeting Proceedings 169-175.

Rasmussen, M.D., Frimer, E.S. y Decker, E.L., 1994. Reverse pressure gradients across the teat canal related to machine milking. *J. Dairy Sci.* 77: 984-993.

Reinemann, D.J., Mein, G.A. y Ruegg, P.L., 2001. Evaluating milking machine performance. VII Congreso Internacional de Medicina Bovina, Oviedo Julio.

Reinemann, D.J., Rasmussen, M.D. y LeMire, S.D., 2002. Milking performance of dairy cows subjected to electrical current and induced milking machine problems. *Am. Soc. Agr. Eng.* 45, 3: 833-838.

Reinemann D.J., 2007. Latest thoughts on methods for assessing teat condition. NMC Annual Meeting Proceedings. San Antonio, Texas, January 21<sup>st</sup>- 24<sup>th</sup>.

Ring, E.F.J., 2004. The historical development of thermal imaging. *Rheumatology*. 43: 800-802.

Rønningen, O. y Reitan, A., 1990. Influence of static and dynamic teat characteristics and milking time on udder health in Norwegian red cattle. *J. Dairy Res*, 57, 2: 171-177.

Ruberte, J., Carretero, A., Fernández, M., Pons, J., Gine, J.M. y Sautet, J., 1994 Anatomía de la ubre de la oveja: Datos morfológicos necesarios para comprender la producción de leche y el ordeño. *Ovis*. 32: 9-16.

Rudovsky, H.J., Hoffmann, H.W. y Wehowsky, G., 1992. Effect of stimulation and machine milking on the stiffness of the tissue of the teat tips. *Beiträge zum Internationalen Kolloquium: Stimulation und Melken. Leipzig*. 227-237.

Salama, A.A.K., Such, X., Caja, G., Rovai, M., Casals, R., Albanell, E., Marin, M.P. y Marti, A., 2003. Effects of once versus twice daily milking throughout lactation on milk yield and milk composition in dairy goats. *J. Dairy Sci.* 86:1673–1680.

Santos, D., Vicente, W. y Canola, J. 2004. B-mode ultrasonography in cows during lactation to evaluate the teat anatomy using four different techniques. *Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.* 41: 350-354



Saratis, P. y Grunert, E., 1993. Ultraschallunters chung zur Abrenzung der räumlichen Ausdehnung von Zitzenstenosen und anderen Zitzenveränderungen beim Rind. Dtsch. Tierärztl Wschr; 100: 159-163.

Schaefer, A.L., Jones, S.D.M., Murray, A.P., Sather, A.P. y Tong, A.K.W., 1989. Infrared thermography of pigs with known genotypes for stress susceptibility in relation to pork quality. Can .J. Anim. Sci., 69: 491-495.

Schaefer, A.L., Cook, N.J., Tessaro, S.V., Deregt, D., Desroches, G., Dubeski, P.L., Tong, A.K.W. y Godson, D.L., 2004. Early detection and prediction of infection using infrared thermography. Can. J. Anim. Sci. 84:73–80.

Schaefer, A.L., Cook, N.J., Church, J.S., Basarab, J., Perry, B., Miller, C. y Tong, A.K.W., 2007. The use of infrared thermography as an early indicator of bovine respiratory complex in calves. Res. Vet. Sci. 83:376–384.

Schneider, 1981. Citado por Issaksson y Lind, 1992.

Schultze, W.D. y Bright, S.C. 1983. Changes in penetrability of bovine papillary duct to endotoxin after milking. Am. J. Vet. Res. 44, 2373-2375.

Seker, I., Risvanli, A., Yuksel, M., Saat, N. y Ozmen, O., 2009. Relationship between California Mastitis Test score and ultrasonographic teat measurements in Dairy cows. Aus. Vet. J. 87, 12: 480-483.

Sendag, S. y Dinç, D.A., 1999. Inerklerde memenim ultrasonografisi. Tr. J. of Vet. Animal Sci. 3: 545-552.

Shearn, M.F.H. y Hillerton, J.E., 1996. Hyperkeratosis of the teat duct orifice in the dairy cow. J. Dairy Res. 63: 525-532.

Sinapis, E., Marnet, P.G., Skapetas, B. y Hatziminaoglou, I. 2006. Effect of vacuum level on milking efficiency, somatic cell counts (SCC) and teat end wall thickness in ewes of Greek Mountain Boutsiko breed. *Livestock Sci.* 104: 128-134.

Sinapis E. y Vlachos I. 1999. Influence de niveau de vide de la machine à traire et des facteurs zootechniques sur les comptages de cellules somatiques chez les chèvres locales grecques. *Proceedings of the Sixth International Symposium on the Milking of Small Ruminants.* EAAP Publication No 95. 513- 518.

Skapetas, B., Katanos, J., Laga, V., Sinapis, E. y Hatziminaoglou, I., 2008. Vacuum level for opening the teat sphincter and the change in the teat end wall thickness in response to the machine milking of indigenous Greek goats. *Czech J. Anim. Sci.*, 53, 3: 112–118.

Ślósarz, P., Wójtowski, J., Bielińska, S., Frąckowiak, A., Ludwiczak, A., Krzyżewski, J., Bagnicka, E. y Strzałkowska, N., 2010. Machine induced changes of caprine teats diagnosed by ultrasonography. *Afr. J. Biotechnol.* 9 (50), 8698–8703.

Smith, M.C. y Sherman, D.M., 2009. *Goat Medicine.* Editorial Wiley-Blackwell. 888p.

Spanu, C., Reinemann, D.J., Momont, H., Cook, N., Ruegg, P.L. y Bade, D.R., 2008. Ultrasonic assessment of teat tissue congestion. *ASABE Annual International Meeting Proc.*, Providence, RI, American Society of Agricultural and Biological Engineers. St. Joseph, MI.

Spencer, S., 1995. What happens inside and outside the teat. *Proc. National Mastitis Council Regional Mtg.* Harrisburg, Pennsylvania. 41-45.

Stádník, L., Louda, F., Bezdiček, J. Ježkova, A. Rákos, M., 2010. Changes in tesat parameters caused by milking and their recovery to their initial size. *Ar. Tierzucht* 6: 650-662.

Stelletta, C., Murgia, L., Caria, M., Giancesella, M., Pazzona, A. y Morgante, M., 2007. Thermographic study of the ovine mammary gland during different working vacuum levels. *Ital. J. Anim. Sci.* vol. 6 (suppl. 1): 601.

Stocker, H., Bättig, U. y Duss, M., 1989. Die Abkalärung von Zitzenstenosen beim Rind mittels Ultraschall. *Tierärztl Prax.* 17: 251-256.

Szentkuti, A., Kavanagh, H.S. y Grazio, S., 2011. Infrared thermography and image analysis for biomedical use. *Pediodicum Biologotum.* 113, 4: 385-392.

UNE 68048. Instalaciones de ordeño. Vocabulario. Ed. IRANOR. Madrid 1998; pp 21.

Vandeputte-van Messom, G., Burvenich, C. y Peeters, G., 1986. Involvement of beta-e-adrenoceptors in teat sphincter function in the lactating cow. *Arch. Int. Physiol. Biochem.* 94: 34.

van der Tol, P.P.J., Schrader, W. y Aernouts, B., 2010. Pressure distribution at the teat-liner and teat-calf interfaces. *J. Dairy Sci.* 93: 45–52

Vegricht, J., Machálek, A., Ambrož, P., Brehme, U. y Rose, S., 2007. Milking-related changes of teat temperature caused by various milking machines. *Res. Agr. Eng.,* 53, 4: 121–125.

Weiss, D., Weinfurtner, M. y Bruckmaier, R.M., 2004. Teat anatomy and its relationship with quarter and udder milk flow characteristics in dairy cows. *J Dairy. Sci.* 87: 3280-3289.

Will, S., Würgau, T. y Fraunholz, J., 1990. Sonographische Befunde an der Papilla mammae des Rindes. *Dtsch. Tierärztl Wschr.* 97: 403-406.

Willard, S., Dray, S., Farrar, R., McGee, M., Bowers, S., Chromiak, A. y Jones, M., 2007. Use of infrared thermal imaging to quantify dynamic changes in body temperature following lipopolysaccharide (LPS) administration in dairy cattle. *J. Anim. Sci.* 85(Suppl. 2):26. (Abstr.)

Williams, D.M. y Mein, G.A., 1985. The role of machine milking in the invasion of mastitis organisms and implications for maintaining low infection rates. *Kiel. Milchwirtsch. Forschungsber.* 37, 4:415-425.

Witzig, P. y Hugelshofer, J., 1984. Clarification of teat stenoses using radiography double contrast staining. *Schweizer Archiv für Tierheilkunde*, 126: 155-163.

Witzig, P., Rusch, P. y Berchtold, M., 1984. Diagnosis and treatment of the teat stenoses in dairy cattle with special reference to radiography and thelotomy. *Vet. Medical Rev.*, 2: 123–132.

Wójtowski, J., Ślósarz, P., Bielińska, S., Nowicki, S., Gut, A. y Danków, R., 2006. Ultrasound image of morphological changes of teat end in sheep caused by machine milking. *Arch. Tierz. Dummerstorf* 49 (Special issue), 231–237.

Zecconi, A., Hamann, J., Bronzo, V. y Ruffo, G., 1992. Machine-induced teat tissue reactions and infection risk in a dairy herd free from contagious mastitis. *J. Dairy Res.* 59:265-271.

Zecconi, A., Hamann, J., Bronzo, V., Moroni, P., Giovannini, G. y Piccini, R., 2000. Relationship between teat tissue immune defences and intramammary infections. *Adv. Exp. Med. Biol.* 480. 287-293.

Zeng, S.S., Escobar, E.N. y Popham, T., 1997. Daily variations in somatic cell count, composition, and production of Alpine goat milk. *Small Rumin. Res.* 26: 253–260.