



Programa de Doctorado en Recursos y Tecnologías Agrarias,
Alimentarias y Agroambientales

Empleo de la enzima N-acetil- β -D-glucosaminidasa para la detección de mamitis en ovejas lecheras

Yolanda Miralles López

Directora de la tesis

Dra. Gema Romero Moraleda

Codirector de la tesis

Dr. José Ramón Díaz Sánchez

Universidad Miguel Hernández de Elche

- 2025 -



La presente Tesis Doctoral, titulada “**Empleo de la enzima N-acetil- β -D-glucosaminidasa para la detección de mastitis en ovejas lecheras**”, se presenta bajo la modalidad de **tesis por compendio** de las siguientes **publicaciones**:

- **Miralles, Y.**; Fornés, V.; Roca, A.; Muelas, R.; Díaz, J.R.; Romero, G. 2024. Factors affecting N-acetyl- β -D-glucosaminidase as an indicator for mastitis detection in dairy sheep. *Animal*. 18: 101111. <https://doi.org/10.1016/j.animal.2024.101111>
- **Miralles, Y.**; Fornés, V.; Roca, A.; Muelas, R.; Díaz, J. R.; Romero, G. 2025. N-acetyl- β -D-glucosaminidase analysis in sheep milk can detect early intramammary infection with high yields if incorporated into mathematical algorithms. *Animals*. 15: 371. <https://doi.org/10.3390/ani15030371>





La Dra. Dña. **Gema Romero Moraleda**, directora, y el Dr. D. **José Ramón Díaz Sánchez**, codirector de la tesis doctoral titulada **“Empleo de la enzima N-acetil- β -D-glucosaminidasa para la detección de mamitis en ovejas lecheras”**

CERTIFICAN:

Que Dña. **Yolanda Miralles López** ha realizado bajo nuestra supervisión el trabajo titulado **“Empleo de la enzima N-acetil- β -D-glucosaminidasa para la detección de mamitis en ovejas lecheras”** conforme a los términos y condiciones definidos en su Plan de Investigación y de acuerdo al Código de Buenas Prácticas de la Universidad Miguel Hernández de Elche, cumpliendo los objetivos previstos de forma satisfactoria para su defensa pública como tesis doctoral.

Lo que firmamos para los efectos oportunos.

Gema Romero Moraleda
Directora de la tesis

José Ramón Díaz Sánchez
Codirector de la tesis

Dr. Dña. Juana Fernández López, Catedrática de Universidad y Coordinadora del Programa de Doctorado en Recursos y Tecnologías Agrarias, Agroambientales y Alimentarias (ReTos-AAA) de la Universidad Miguel Hernández de Elche (UMH),

CERTIFICA:

Que la Tesis Doctoral titulada **“Empleo de la enzima N-acetil-β-D-glucosaminidasa para la detección de mamitis en ovejas lecheras”** de la que es autora **Dña. Yolanda Miralles López**, ha sido realizada bajo la dirección de la Dra. **Gema Romero Moraleda (UMH)** y la codirección del Dr. **José Ramón Díaz Sánchez (UMH)**, actuando como tutora de la misma la Dra. Juana Fernández López (UMH). Considero que la Tesis es conforme, en cuanto a forma y contenido, a los requerimientos del Programa de Doctorado ReTos-AAA por tanto, apta para su exposición y defensa pública.

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

Dra. Dña. Juana Fernández López

Coordinadora del Programa Doctorado ReTos-AAA

*Coordinadora: Dra. Juana Fernández López
Dpto. Tecnología Agroalimentaria, Escuela Politécnica Superior de Orihuela, Ctra. Beniel Km 3,2
Orihuela-03312, Alicante, España. <http://retos-aaa.edu.umh.es/>
j.fernandez@umh.es: Tlfn: +34 966749784*

ÍNDICE

ABREVIATURAS	8
ESTRUCTURA DE LA TESIS	10
RESUMEN	11
ABSTRACT	13
I. INTRODUCCIÓN	16
1. SITUACIÓN SOCIOECONÓMICA DEL GANADO OVINO	16
2. LA MAMITIS EN EL GANADO OVINO	17
2.1. DEFINICIÓN Y TIPOS	17
2.2. PREVALENCIA	20
2.3. ETIOLOGÍA.....	22
2.3.1. No infecciosa	22
2.3.2. Infecciosa.....	22
3. CAMBIOS EN LA PRODUCCIÓN Y COMPOSICIÓN DE LA LECHE DERIVADOS DE LA MAMITIS	25
3.1.1. Producción.....	25
3.1.2. Composición.....	27
3.1.3. Rendimiento quesero	31
4. MÉTODOS DE DIAGNÓSTICO DE MAMITIS	32
4.1. MÉTODOS DIRECTOS	33
a) Cultivo bacteriológico	33
b) Reacción en cadena de la polimerasa	34
4.2. MÉTODOS INDIRECTOS	35
a) Recuento de células somáticas	35
b) California mamitis test.....	37
c) Conductividad eléctrica	38
d) Variación en la composición y el pH de la leche	39
e) β -glucuronidasa	40
f) Fosfatasa alcalina.....	41
g) Lactato deshidrogenasa.....	41
h) Catelecidina	42
i) Proteínas de la fase aguda.....	43
j) Ultrasonografía	44

k) Catalasa.....	45
l) N-acetil- β -D-glucosaminidasa.....	46
m) Métodos basados en el uso de biosensores.....	46
5. DETERMINACIÓN DE NAGasa COMO MÉTODO DE DIAGNÓSTICO DE MAMITIS.....	49
5.1. INTRODUCCIÓN.....	49
5.2. DETERMINACIÓN.....	50
5.3. NIVELES FISIOLÓGICOS	51
5.4. VARIACIÓN NAGASA SEGÚN ESTADO SANITARIO DE LA GLÁNDULA MAMARIA.....	52
5.5. OTROS FACTORES DE VARIACIÓN.....	55
a) Estado de lactación	56
b) Número lactación.....	58
c) Ordeño	59
d) Fracción de leche.....	59
e) Tipo patógeno	60
f) Efecto rebaño.....	61
g) Estación	61
5.6. RELACIÓN ENTRE LA NAGasa Y OTROS MÉTODOS DETECCIÓN DE MAMITIS	62
a) Recuento de células somáticas	62
b) Conductividad eléctrica	63
c) Lactato deshidrogenasa.....	64
d) Lactoferrina	64
II. OBJETIVOS	65
III. MATERIALES Y MÉTODOS GENERALES.....	66
1. AUTORIZACIÓN ÉTICA.....	66
2. MANEJO DE ANIMALES.....	66
3. DISEÑO EXPERIMENTAL.....	67
3.1. ESTUDIO 1	67
3.2. ESTUDIO 2	68
4. VARIABLES MEDIDAS EN LA LECHE.....	68
5. CLASIFICACIÓN DE LAS GLÁNDULAS SEGÚN ESTADO SANITARIO	70
6. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	71
IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	75

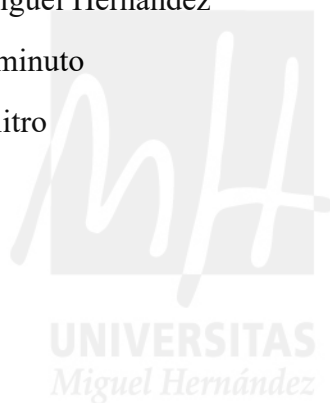
1. ESTUDIO 1	75
2. ESTUDIO 2	79
V. CONCLUSIONES	84
VI. REFERENCIAS	85
VII. ANEXO. COPIA SEPARATAS DE LOS ARTÍCULOS.....	107
VIII. AGRADECIMIENTOS.....	109



ABREVIATURAS

ADN	Ácido desoxirribonucleico
AUC	Área under the curve
CE	Conductividad eléctrica
CMT	California mamitis test
cel/mL	Células por mililitro
Cl	Cloro
DE	Desviación estándar
ECN	Estafilococos coagulasa negativos
ECP	estafilococos coagulasa positivos
FAO	Food Agriculture Organization of the United Nations
GHS	Gland health status
g/l	Gramo por litro
Hp	Haptoglobina
IMI	Infección intramamaria
K	Potasio
KPa	Kilopascal
LDH	Lactato deshidrogenasa
Lf	Lactoferrina
Log	Logaritmo
MAPA	Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación
mEq/L	Miliequivalente por litro
mg/kg	Miligramos por Kilo
mM	Milimolar
mmol/L	Milimoles por litro
mS/cm	Milisiemens por centímetro
MU	Metilumbeliferona
MUAG	Metil-umbeliferil-N-acetil- β -d-glucosaminida
Na	Sodio
NAGasa	N-acetil- β -D-glucosaminidasa

NIR	Near Infrared Spectroscopy
nmol/mL	Nanomol por litro
PCR	Polymerase chain reaction
pmol	Picomol
PMN	Neutrófilos polimorfonucleares
RCS	Recuento de células somáticas
RD	Real Decreto
SDS	Situaciones desfavorables para la salud
SERS	Surface-enhanced raman spectroscopy
SIRE	Sensors based on injectable recognition elements
UE	Unión Europea
U/l	Unidades por litro
UMH	Universidad Miguel Hernández
μM/min	Micromol por minuto
μmol/L	Micromol por litro



ESTRUCTURA DE LA TESIS

Para la elaboración de esta Tesis Doctoral se ha seguido la metodología basada en un compendio de publicaciones científicas. La estructura de la misma sigue la normativa de estudios de doctorado de la Universidad Miguel Hernández de Elche para la presentación de "Tesis por compendio de publicaciones".

Este trabajo se ha estructurado en los siguientes apartados:

- Resumen/Abstract: breve introducción donde se expone la problemática del tema, los objetivos de la tesis y los resultados más importantes.
- Introducción: Se presenta el estado del arte y se destaca la relevancia del estudio de las mamitis.
- Objetivos: Se define el objetivo general y los objetivos específicos de la investigación.
- Materiales y Métodos: Se describen las condiciones de manejo de los animales utilizados, el diseño experimental, las variables analizadas y el análisis estadístico utilizado.
- Resultados y Discusión: se realiza un resumen de los resultados más relevantes obtenidos en cada uno de los ensayos, y sus discusiones correspondientes.
- Conclusiones: Se destacan las conclusiones más importantes de este trabajo.
- Referencias: Se enumeran las referencias bibliográficas consultadas para la redacción de esta Tesis.
- Publicaciones: Se adjuntan los artículos científicos que componen la base de esta Tesis:
 - Miralles, Y.; Fornés, V.; Roca, A.; Muelas, R.; Díaz, J.R.; Romero, G. 2024. Factors affecting N-acetyl- β -D-glucosaminidase as an indicator for mastitis detection in dairy sheep. *Animal*. 18: 101111. <https://doi.org/10.1016/j.animal.2024.101111>
 - Miralles, Y.; Fornés, V.; Roca, A.; Muelas, R.; Díaz, J. R.; Romero, G. 2025. N-acetyl- β -D-glucosaminidase analysis in sheep milk can detect early intramammary infection with high yields if incorporated into mathematical algorithms. *Animals*. 15: 371. <https://doi.org/10.3390/ani15030371>

RESUMEN

Las mastitis, son a día de hoy, uno de los mayores problemas para la producción ovina de leche, siendo la infección intramamaria su principal causa. Por un lado, provocan graves pérdidas económicas como consecuencia de una menor producción y rendimiento de la leche, de la pérdida de animales afectados, de los costes del tratamiento y de las pérdidas de leche no considerada apta para el consumo. Por otro lado, suponen un riesgo sanitario debido al consumo de productos lácteos contaminados por algunas bacterias. Y, por último, también causan un problema a nivel de bienestar animal, por el dolor que esta enfermedad puede llegar a provocar. Por lo tanto, el estudio y puesta a punto de nuevos métodos indirectos de detección de mastitis a nivel de granja es un tema de gran relevancia, ya que ayudarán a monitorizar la enfermedad y agilizar la toma de decisiones sobre el tratamiento del animal afectado y el destino de la leche.

La N-acetil- β -D-glucosaminidasa (NAGasa) es una enzima que se encuentra principalmente en los leucocitos y en las células epiteliales secretoras de leche. Durante la mastitis, como resultado del proceso inflamatorio, se producen cambios en las membranas de las células y en la permeabilidad de los vasos, por lo que la NAGasa es liberada a la leche, y sus niveles se elevan durante la enfermedad. Hay estudios que apuntan, que la NAGasa podría resultar un buen indicador para la detección de la mastitis de forma automática durante el ordeño, dado el avance tecnológico conseguido en biosensores en los últimos años.

Por todo esto, el objetivo de esta tesis doctoral, fue analizar el efecto de determinados factores de variación sobre la NAGasa y comprobar si es posible usar esta enzima como método de detección teniendo en cuenta la variabilidad producida por los mismos. Para ello se realizaron dos estudios en ovejas de raza Manchega de la Granja de pequeños rumiantes de la Universidad Miguel Hernández de Elche, en el primero de ellos se observó de manera específica cómo afectaba la infección intramamaria (IMI) y otros los factores no infecciosos (estado de lactación, número de parto, ordeño) sobre la actividad de la enzima en la leche. En el segundo, se investigó el efecto de la instauración de la IMI sobre los valores de la enzima a lo largo de varias semanas, junto con el resto de efectos, comparándolo con animales que permanecieron libres de IMI. En ambos estudios, se analizó la capacidad predictiva de la enzima mediante el uso de distintos algoritmos.

Los resultados mostraron que los factores no infecciosos estudiados, como el estado de lactación, el número de partos y el turno de ordeño, tuvieron un efecto estadísticamente significativo sobre los valores de NAGasa ($p < 0,05$). Los valores más altos se encontraron al inicio y al final de la lactación, en el ordeño de la mañana y en las glándulas de hembras multíparas que presentaban IMI. El estado de salud de la glándula fue el factor que provocó la mayor variación en los niveles de la enzima, mostrando las glándulas con IMI valores más altos que las glándulas sanas. Además, los resultados indicaron que, en las glándulas infectadas, se produjo un aumento muy marcado de los niveles de la enzima en los 4 días que siguieron a la instauración de la infección (51,57 vs 105,69 $\mu\text{M}/\text{min por mL}$).

El estudio de la capacidad predictiva de la enzima mediante el uso de diversos algoritmos, reveló una gran eficacia de la misma. En el primer estudio, se observó que, en el caso de priorizar la sensibilidad, el algoritmo que obtuvo un mejor resultado fue el modelo que incluía NAGasa junto con el estado de lactación y el número de partos, obteniendo una capacidad predictiva de 0,80, una precisión del 70%, una sensibilidad del 73% y una especificidad del 70%. En caso de priorizar la especificidad, el modelo que incluía NAGasa, el estado de lactación, el número de partos y el ordeño fue el que mejor predijo el estado de salud de la glándula mamaria, obteniendo una capacidad predictiva de 0,80, una precisión del 77%, una sensibilidad del 64% y una especificidad del 79%. En el segundo estudio, el modelo que mostró mejores resultados al priorizar la sensibilidad, fue el que identificó en un mínimo de dos días dentro de los cuatro inmediatamente posteriores a la aparición de la infección, un incremento superior al 30% en los niveles de NAGasa, en comparación con la media de los tres días previos a la infección, obteniendo una capacidad predictiva de 0,90, una precisión del 89,8%, una sensibilidad del 95,2% y una especificidad del 85,7%. Al priorizar la especificidad, el mejor modelo fue el que utilizó la misma regla, pero en un mínimo de tres días en lugar de dos, obteniendo una capacidad predictiva de 0,87, una precisión del 87,8%, una sensibilidad del 81% y una especificidad del 92,9%.

Se concluyó que la mamitis afecta a los niveles de la NAGasa (obteniendo los mayores valores las glándulas con mamitis infecciosa), juntamente con otros factores no infecciosos como el estado de lactación, el número de parto o la sesión de ordeño, existiendo una correlación positiva y significativa con el RCS. Al aplicar diferentes algoritmos que incluían la medición diaria de la enzima, se observó que la NAGasa es

capaz de detectar la infección de la glándula mamaria dentro de los primeros 4 días después de la instauración de la infección. Esta rápida detección puede permitir reducir las pérdidas económicas, la severidad de la enfermedad y aumentar el bienestar animal. Varios de los algoritmos estudiados pueden resultar útiles para la detección de la mastitis ya que presentan una capacidad predictiva y precisión altas, así como de sensibilidad y especificidad. La elección del algoritmo dependerá de las necesidades de las explotaciones en función de si necesitan priorizar la especificidad o la sensibilidad.

ABSTRACT

Mastitis is currently one of the biggest problems for dairy sheep production, with intramammary infection being its main cause. On the one hand, it causes serious economic losses due to reduced milk production and yield, the loss of affected animals, treatment costs, and the loss of milk not considered suitable for consumption. On the other hand, it poses a health risk due to the consumption of milk contaminated by certain bacteria. Finally, it also poses an animal welfare problem due to the pain this disease can cause. Therefore, the study and development of new indirect methods for detecting mastitis at the farm level is of great importance, as they will help monitor the disease and streamline decision-making regarding the treatment of affected animals and the disposal of the milk.

N-acetyl- β -D-glucosaminidase (NAGase) is an enzyme found primarily in leukocytes and milk-secreting epithelial cells. During mastitis, as a result of the inflammatory process, changes occur in cell membranes and vascular permeability, causing NAGase to be released into the milk, and its levels rise during the disease. Some studies suggest that NAGase could be a good indicator for the automatic detection of mastitis during milking, given the technological advances achieved in biosensors in recent years. Therefore, the objective of this doctoral thesis was to analyze the effect of certain variation factors on NAGase and to determine whether it is possible to use this enzyme as a detection method, taking into account the variability produced by these factors. To this end, two studies were conducted on Manchega sheep at the Small Ruminant Farm of the Miguel Hernández University in Elche. The first specifically observed how intramammary infection (IMI) and other non-infectious factors (lactation status, parity, milking) affected the enzyme's activity in milk. In the second study, the effect of IMI

administration on enzyme levels was investigated over several weeks, along with other effects, compared with animals that remained IMI-free. In both studies, the enzyme's predictive capacity was analyzed using different algorithms.

The results showed that non-infectious factors studied, such as lactation stage, parity, and milking session, had a statistically significant effect on NAGase levels ($p < 0.05$). The highest values were found at the beginning and end of lactation, during morning milking, and in the glands of multiparous females with IMI. Gland health was the factor that caused the greatest variation in enzyme levels, with glands with IMI showing higher values than healthy glands. Furthermore, the results indicated that, in infected glands, there was a marked increase in enzyme levels in the 4 days following the onset of infection (51.57 vs. 105.69 $\mu\text{M}/\text{min per mL}$).

The study of the enzyme's predictive capacity using various algorithms revealed its high predictive efficacy. In the first study, it was observed that when prioritizing sensitivity, the algorithm that obtained the best result was the model that included NAGase along with lactation stage and parity, obtaining a predictive capacity of 0.80, an accuracy of 70%, a sensitivity of 73%, and a specificity of 70%. While in case of prioritizing specificity, the model that included NAGase, lactation stage, parity, and milking was the one that best predicted mammary gland health, obtaining a predictive capacity of 0.80, an accuracy of 77%, a sensitivity of 64%, and a specificity of 79%. In the second study, the model that showed the best results when prioritizing sensitivity, was the one that identified, within a minimum of two days within the four immediately following the onset of infection, an increase greater than 30% in NAGase levels, compared to the average of the three days prior to infection, obtaining a predictive capacity of 0.90, an accuracy of 89.8%, a sensitivity of 95.2%, and a specificity of 85.7%. When prioritizing specificity, the best model was the one that used the same rule but with a minimum of three days instead of two, obtaining a predictive capacity of 0.87, an accuracy of 87.8%, a sensitivity of 81%, and a specificity of 92.9%.

It was concluded that mastitis affects NAGase levels (with the highest values in glands with infectious mastitis), along with other non-infectious factors such as lactation stage, parity and milking session, with a positive and significant correlation with SCC. When applying different algorithms that included daily measurement of the enzyme, it was observed that NAGase is capable of detecting mammary gland infection within the first 4 days after the onset of infection. This rapid detection can reduce economic losses

and disease severity, and increase animal welfare. Several of the algorithms studied may be useful for detecting mastitis, as they exhibit high predictive capacity and accuracy, as well as sensitivity and specificity. The choice of algorithm will depend on the needs of the farms, depending on whether they prioritize specificity or sensitivity



I. INTRODUCCIÓN

1. SITUACIÓN SOCIOECONÓMICA DEL GANADO OVINO

En el 2023, el rebaño ovino mundial ascendió a 1.300 millones de animales, siendo China el país con mayor número de ovejas del mundo (192.983.895 animales), representando un 15% del total, seguida de la India con un 6% (77.423.974 animales) y de Australia con un 5% (72.102.519 animales) (FAO, 2023). En Europa, la población ovina se estimó en 117 millones de cabezas, siendo España el país de la Unión Europea (UE) con mayor número de animales (13.596.561) lo que supone un 12 % del total, seguida de Rumanía con un 9% (10.299.500 animales), Grecia con un 7% (7.892.300 animales), y Francia e Italia con un 6% (6.576.000 y 6.497.000 animales respectivamente) (FAO, 2023). En España, los ingresos derivados de la producción de leche de oveja y sus productos, son de gran importancia para la economía de los ganaderos. En el 2023, del total de ovejas censadas en España, 10.435.756 fueron hembras (incluyendo la reposición), estos valores son inferiores a los registrados en el 2022, en el que el recuento fue de 14.452.585 animales. Si comparamos estas cifras con las de 2013 (16.118.586 cabezas), se observa en la última década una tendencia a la baja en el censo ovino español del 16% (MAPA, 2023). Las comunidades autónomas con mayor cantidad de animales fueron, Extremadura con un 26% del total (3.526.119 animales), y Castilla León y Castilla la Mancha con un 16% (2.147.532 y 2.211.215 animales, respectivamente). Del censo total de ganado ovino, el número de ovejas reproductoras dedicadas a la producción de leche fue de 1.861.966 en 2023, lo que supone un descenso de un 7% con respecto al año anterior. En el 2013, el número de reproductoras productoras de leche fue de 2.315.850, lo que representa una disminución de casi el 20% en estos años (MAPA, 2023).

La producción mundial de leche de oveja durante el año 2023 se estimó en 10.017.335 toneladas. Los países con mayor producción fueron China con un 13% del total (1.303.728 toneladas), y Grecia y Turquía con un 9% (943.970 y 933.575 toneladas respectivamente) (FAO, 2023). En Europa, la producción fue de 3.066.305 toneladas, siendo Grecia el país con la mayor producción con un 31% del total (943.970 toneladas), seguida de España con un 17% (529.900 toneladas) e Italia con un 15% (471.290 toneladas) (FAO, 2023). En España, la producción global de leche fue de 8.564.600 toneladas, de esta cantidad, 529.900 toneladas corresponden a leche de oveja, lo que

supone un 6% del total. Castilla León y Castilla la Mancha son las comunidades que producen el 88% del total de leche de oveja del país, con un 55% Castilla León y un 33% Castilla la Mancha. España es el segundo país que más leche de oveja produce en la UE, quedando en quinta posición a nivel mundial, con un 5% de la producción total (MAPA, 2023).

El destino final de la mayoría de la leche procedente del ganado ovino se destina a la producción de queso. El queso puro de oveja supone el 14% de la elaboración total de queso en España. En 2023, España produjo casi 75.000 toneladas de queso de oveja, convirtiéndose en el país de la UE con mayor producción, representando el 34% del total europeo. Italia y Francia son los siguientes países con mayor producción de queso puro de oveja, elaborando cada uno alrededor de un 30% de la producción total de la UE (MAPA, 2023).

España es reconocida por elaborar una gran variedad de quesos, situándose entre los países con más diversidad del mundo en este ámbito. Podemos encontrar más de 150 variedades de queso, de las que muchas cuentan con la certificación de Indicaciones Geográficas Protegidas y Denominaciones de Origen Protegida. Estas distinciones se otorgan a ciertos productos para garantizar que tienen un origen geográfico específico y que tienen cualidades y características especiales debido a ese origen. En España tenemos 6 Denominaciones de Origen Protegida de queso puro de oveja, de estos, la mayor producción corresponde al Queso Manchego con un 88% del total. Este queso está producido por la raza autóctona Manchega con 169.840 animales inscritos en el Libro Genealógico.

Cada vez el mercado impone medidas más exigentes de calidad y productividad, que hacen necesario continuar la investigación en el ganado ovino para conseguir optimizar la producción, promover una mejor calidad higiénico-sanitaria de la leche, aumentar su calidad y la de sus productos derivados, y mejorar el bienestar animal.

2. LA MAMITIS EN EL GANADO OVINO

2.1. DEFINICIÓN Y TIPOS

El término mamitis se refiere a la inflamación que se produce en la glándula mamaria como respuesta ante un daño producido en ese tejido. Este daño, con mayor frecuencia suele ser provocado por la introducción de un agente patógeno (Albenzio *et al.*, 2002).

Los microorganismos, casi en la totalidad de los casos, penetran en la glándula mamaria a través del canal del pezón, y si el animal no es capaz de eliminarlos, invaden el tejido mamario y se provoca una respuesta inmune, aumento de leucocitos (principalmente polimorfonucleares neutrófilos (PMN), macrófagos y linfocitos). El proceso inflamatorio produce un daño en el epitelio mamario y el endotelio capilar, que se traduce en un aumento de la permeabilidad vascular, y que provoca una salida de estos leucocitos desde la sangre hacia los alvéolos y a la leche. Estos leucocitos, y en menor cantidad las células epiteliales, son las células somáticas. El recuento de estas células somáticas (RCS) en la leche es uno de los métodos más usados para el diagnóstico de las mastitis (Kelly *et al.*, 2011).

Las mastitis infecciosas son una enfermedad multifactorial que suele aparecer como consecuencia de la interacción entre diversos factores (las condiciones de manejo, el medio ambiente, el agente patógeno y el propio animal), que favorecen la entrada de agentes patógenos en la glándula mamaria, normalmente por el canal del pezón. Cuanto mayor sea la cantidad de microorganismos y su patogenicidad, mayor serán los daños provocados en la glándula mamaria. La susceptibilidad del animal va a depender de varios factores como pueden ser el estado inmunitario inicial, número y estado de lactación, la disposición anatómica de la glándula y factores genéticos.

Las mastitis pueden clasificarse de varias maneras según el factor que consideremos. Si tenemos en cuenta su etiología podemos encontrar:

- Mastitis infecciosa: causadas principalmente por bacterias (mayoritariamente por estafilococos, estreptococos, enterobacterias, pseudomonas y corinebacterias) y hongos.
- Mastitis no infecciosa: causadas por traumatismos, tóxicos, alergias y/o neoplasias.

Si para la clasificación consideramos la duración del proceso, se pueden dividir en:

- Mastitis agudas: se observan signos muy evidentes de la enfermedad a nivel de glándula (aparecerá roja, hinchada, con dolor a la palpación), de animal (fiebre, disminución en la actividad, pérdida del apetito, debilidad) y de leche (aspecto alterado y producción disminuida)
- Mastitis crónicas: la inflamación de la glándula se mantiene durante un periodo de tiempo muy largo. Se puede encontrar una mayor dureza de la glándula

afectada, asimetría de la ubre, presencia de abscesos y una menor producción de leche.

Si tenemos en cuenta su manifestación clínica, pueden clasificarse en:

- Mamitis clínica: el proceso inflamatorio puede observarse mediante la exploración clínica del animal. Se encuentran signos locales en la glándula mamaria (dolor, inflamación, abscesos...), un empeoramiento en el estado general del animal (fiebre, debilidad, anorexia...) y/o signos funcionales (disminución de la producción, cambios en las características macroscópicas y organolépticas de la leche...).

- Mamitis subclínica: ni la glándula ni el animal presentan signos clínicos de la enfermedad, y tampoco se observan alteraciones en el aspecto macroscópico de la leche, aunque sí muestra cambios en su perfil bioquímico y un RCS más alto que la leche que procede de las glándulas sin la enfermedad.

El diagnóstico de las mamitis clínicas es mucho más sencillo que el de las subclínicas, ya que en estas últimas, el animal, la ubre y la leche se encuentran aparentemente normales (Anderson *et al.*, 2002). Aunque externamente no se observe ninguna anomalía, sí se producen alteraciones en la producción, en su constitución y en determinadas variables de la leche, lo que hace necesario el uso de métodos de diagnóstico que pongan de manifiesto dichos cambios, midan el grado de inflamación de la glándula y/o la presencia de patógenos. Puede suceder que, en ocasiones, se obtengan resultados falsos negativos si se analiza únicamente un cultivo microbiológico aislado, ya que puede que no se observe el agente etiológico debido a tratamientos antibióticos recientes, a que haya una excreción bacteriana muy baja, a errores en el laboratorio, etc. También puede ocurrir que se obtengan falsos positivos debido a contaminación de las muestras o que sea un aislamiento positivo aislado en leche procedente de glándulas sanas, por lo que lo recomendable es considerar las glándulas como infectadas cuando se obtengan dos aislamientos seguidos producidos por el mismo microorganismo y que, además, haya un aumento del RCS (Sánchez *et al.*, 1996).

A pesar de la introducción de programas de control, la mamitis sigue siendo uno de los mayores problemas para la producción ovina de leche que afecta a cuatro niveles:

- Económico: se producen grandes pérdidas debido a una disminución en la producción y en el rendimiento de la leche, a los gastos que supone el tratamiento de la enfermedad, al sacrificio de los animales enfermos, a la leche desechada porque no es seguro su consumo, a la disminución del crecimiento de los corderos, etc. Teniendo en

cuenta que la mayor parte de la producción lechera ovina está destinada a la producción de quesos, las mastitis generan grandes pérdidas económicas (Leitner *et al.*, 2008). La estimación del coste por oveja con mastitis subclínica puede rondar los 80€, mientras que el de una mastitis clínica puede superar los 300€ (HIPRA, 2020).

- Higiénico: puede existir la probabilidad de desarrollar una infección o de padecer una intoxicación provocada por el consumo de leche contaminada por algunos tipos de bacterias como *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* spp, etc)

- Legal: El Reglamento (CE) n.º 853/2004 del Parlamento Europeo y del Consejo define la calidad bacteriológica de la leche, regulando parámetros microbiológicos generales como el recuento de gérmenes a 30 °C, y en el caso de vacuno, controlando también el contenido de células somáticas.

- Bienestar animal: algunas mastitis pueden provocar mucho dolor, lo que puede llevar a estados de ansiedad, inactividad y cambios del comportamiento en los animales (Fthenakis y Jones, 1990; Gougoulis *et al.*, 2008, 2010).

Por todos estos motivos resulta de gran importancia el desarrollo de nuevos métodos tempranos de detección que permitan el tratamiento y la reducción de los efectos de la enfermedad, sobre todo de las mastitis subclínicas, ya que son las que producen mayores pérdidas económicas.

2.2. PREVALENCIA

La prevalencia de las mastitis puede variar en función de factores abióticos, como pueden ser las condiciones de alojamiento, la manipulación de los animales, el sistema de ordeño y de factores bióticos, como el agente patógeno que provoca la mastitis, la raza, características morfológicas de la ubre, número de lactación y capacidad productiva del animal (Tzanidakis *et al.*, 2021). En la tabla 1 se recopila un resumen de las distintas prevalencias de mastitis publicadas por distintos autores.

Tabla 1. Prevalencia de infección intramamaria en oveja publicada en diferentes trabajos de investigación.

Referencia	Nº rebaños	Nº ovejas	Nº muestras	% glándulas infectadas	% ovejas infectadas	% prevalencia
Martins <i>et al.</i> (2013)	1	37	444	-	58	-

Rovai <i>et al.</i> (2014)	1	108	108	-	-	46
Addis <i>et al.</i> (2016)	3	350	705	-	21	37
Caria <i>et al.</i> (2016)	12	300	540	24	-	-
Vasileiou <i>et al.</i> (2018)	111	2198	2198	-	25	26
Tzanidakis <i>et al.</i> (2021)	20	400	9624	-	-	53
Michael <i>et al.</i> (2023)	12	240	1896	-	-	52
Kalogianni <i>et al.</i> (2025)	4	527	1581	-	82	-

En pequeños rumiantes, la prevalencia de la mamitis clínica está entre el 5-10%, mientras que la subclínica suele alcanzar valores entre el 10-40%, porcentaje que puede llegar a disminuir hasta el 5% si los animales son mantenidos con buenas condiciones higiénico-sanitarias (Bergonier y Berthelot, 2003; Contreras *et al.*, 2007; Silanikove *et al.*, 2010; Rovai *et al.*, 2014).

En oveja, distintas investigaciones concluyeron que se producía un aumento en la prevalencia de mamitis conforme aumenta el número de lactaciones (Al-Majali y Jawabreh, 2003; Ergün *et al.*, 2009). De acuerdo con los estudios anteriores, Leitner *et al.* (2003) obtuvieron un 70,7% de glándulas sanas en hembras primíparas, disminuyendo a medida que aumentó el número de parto, hasta alcanzar un 64,6% para animales de segunda lactación y un 52,2% para animales de tercera. Bergonier y Berthelot (2003) describieron que en ovejas hay una mayor incidencia de mamitis subclínicas en animales mayores de 2 años y múltiparas. Resultados similares fueron obtenidos por Fthenakis y Jones (1990) y Watson *et al.* (1990), llegando a la conclusión de que esa alta prevalencia fuese debida a un estrés acumulativo en los tejidos mamarios. Sin embargo, otros autores no encontraron esta relación entre el número de parto y la aparición de mamitis (Mc Dougall *et al.*, 2002), aunque sí se observó que la infección aparecía más pronto en animales con menor número de parto (Sevi *et al.*, 2000).

En cuanto al progreso de la lactación, los resultados difieren según la fuente consultada, aunque son más los que apoyan que la prevalencia es mayor al inicio de la lactación. Bergonier y Berthelot, en el mismo estudio de 2003, vieron un porcentaje más alto de mamitis al inicio de la lactación, principalmente en el ordeño mecánico (aunque también se dio en el amamantamiento cuando se realizaba), observando que la incidencia de infecciones mamarias inespecíficas estaba relacionada con el diseño y ajuste de la máquina de ordeño y con la rutina de ordeño (ordeño manual y mecánico). McDougall *et al.* (2002) observaron al inicio de la lactación una prevalencia de mamitis subclínica

del 19%, que disminuyó al 9,1% pasados 40 días. Estos estudios apoyan otras investigaciones en las que también se observó una incidencia más alta al inicio de la lactación (Bergonier *et al.*, 2003; Leitner *et al.*, 2008). Sin embargo, otras investigaciones observaron que la prevalencia de la mamitis subclínica no varió a lo largo de la lactación. Leitner *et al.* (2001) concluyeron que, realizar una toma de muestras en las dos primeras semanas del periodo de lactación podía determinar la salud de los animales en el resto del periodo, pues observaron que en el 90% de las veces no hubo variación del estado infeccioso.

En el ganado ovino hay estudios que muestran que un aumento del potencial productivo de los animales resultaba en un aumento similar en la incidencia y severidad de las mamitis y otras enfermedades de la glándula mamaria (Watson y Buswell, 1984), por lo que las mejoras en la aptitud lechera pueden conllevar un aumento en la susceptibilidad de sufrir mamitis (Barillet *et al.*, 2001). En ganado caprino se cree que puede deberse a que la selección de animales con mayor producción lechera conlleva una disminución en la cantidad de genes que intervienen en una mayor resistencia a las mamitis (Amorena y Tejedor, 1990). Por esto se recomienda a la hora de realizar la selección genética optar por conservar los parámetros productivos a la vez que la prevalencia de mamitis se mantiene en unos niveles aceptables.

2.3. ETIOLOGÍA

Las mamitis pueden ser producidas por agentes infecciosos como bacterias, hongos o virus) o por otras causas no infecciosas.

2.3.1. No infecciosa

Son un porcentaje minoritario de las mamitis, y pueden estar producidas por traumatismos en la ubre como golpes o pisotones, por irritación química debido a tratamientos con fármacos intramamarios o por un mal funcionamiento de la máquina de ordeño, entre otros aspectos, niveles de vacío, relación de pulsación y frecuencias no adecuados (Vasileiou *et al.*, 2019a).

2.3.2. Infecciosa

La mayor parte de las mamitis infecciosas en pequeños rumiantes son provocadas por agentes bacterianos, siendo los que se aíslan más frecuentemente las diferentes especies de estafilococos, especialmente estafilococos coagulasa negativos (ECN) y *S.*

aureus (Vasileiou *et al.*, 2018; Vasileiou *et al.*, 2019b; Michael *et al.*, 2023; Iancu *et al.*, 2024). Otros agentes que pueden causar la enfermedad, pero en menor proporción son estreptococos, enterobacterias, pseudomonas, corinebacterias y hongos (Contreras *et al.*, 2007). En la tabla 2 se muestra la variabilidad existente entre los patógenos aislados en las mamitis en función de la fuente que se consulte.

Tabla 2. Etiología de las mamitis en ganado ovino (%) publicada en diferentes trabajos de investigación.

	Gonzalo <i>et al.</i> (2002)	Berthelot <i>et al.</i> (2006)	Dore <i>et al.</i> (2016)	Queiroga <i>et al.</i> (2017)	Vasileiou <i>et al.</i> (2019b)	Michael <i>et al.</i> (2023)	Iancu <i>et al.</i> (2024)
ECN	62,2	87,5	39,9	70,1	59,7	72,1	-
ECP	-	-	-	0,3	-	-	-
<i>S. aureus</i>	4,3	0,8	13,5	6,2	10,1	19,2	88,4
<i>Enterobacterias</i>	2	-	3,8	0,9	3,4	1,5	-
<i>Corynebacterium spp.</i>	13,8	1,9	1	5,1	5,3	0,5	-
<i>Streptococcus spp.</i>	3,9	2	7,9	7,4	4,7	6,6	9,6
<i>Micrococcus spp.</i>	-	-	-	1,7	2,6	0,5	-
ECN+ <i>Streptococcus sp.</i>	-	-	-	-	-	0,5	-
Organismos Gram -	0,4	1,2	1,8	1,2	4,6	-	3,4
<i>Pseudomonas spp.</i>	-	-	4,3	2,3	-	-	4,1
<i>Enterococcus spp.</i>	-	-	-	4,6	1,2	-	4,8
<i>Trueperella pyogenes</i>	-	-	-	0,6	2,5	-	-
<i>Bacillus spp.</i>	-	-	-	-	1,6	-	-
<i>A. pyogenes</i>	0,7	-	-	-	-	-	-
Cultivos mixtos	8	-	-	-	-	-	-
Otros	3	-	-	-	5,9	-	-

ECN: estafilococos coagulasa negativos; ECP: estafilococos coagulasa positivos

La patogenicidad del agente influye directamente en algunos indicadores de la presencia de mamitis, como pueden ser el RCS y la producción de leche. Se ha visto que los llamados patógenos menores, como los ECN, las corinebacterias y los micrococos, provocan niveles de RCS menores y una producción láctea más elevada que las glándulas infectadas con patógenos mayores, como los estafilococos coagulasa positivos, las enterobacterias, los estreptococos, las pasterelas, las pseudomonas y los micoplasmas (Gonzalo *et al.*, 2002). Aunque esto es así de manera general, se ha observado que algunos patógenos dentro de los ECN pueden provocar daños parecidos a los que provocan los patógenos mayores, por lo que algunos autores han propuesto dividir a los ECN en dos grupos con distinta patogenicidad (Gonzalo *et al.*, 1998; Ariznabarreta,

1999). Un primer grupo, está formado por bacterias resistentes a la novobiocina, y se comportan de una forma más parecida a los considerados patógenos menores como los micrococcos y corinebacterias produciendo cambios leves tanto en el RCS como en la producción de leche, y entre ellos encontramos a *S. xylosus* y *S. lentus*. Un segundo grupo, está compuesto por bacterias sensibles al antibiótico, que causan mayores cambios en el RCS y en la producción de leche, parecidos a los observados en los patógenos mayores como los estafilococos coagulasa positivos, estreptococos y enterobacterias, y entre ellos encontramos a *S. aureus*, *S. caprae*, *S. epidermidis*, *S. chromogenes* y *S. haemolyticus* (Gonzalo *et al.*, 2002).

Otra manera de clasificar a los agentes, es en función de cuál es su hábitat, dividiéndose en agentes ambientales, oportunistas y contagiosos (Corrales *et al.*, 1997). Los microorganismos ambientales suelen encontrarse en las camas de los animales, el suelo, el agua, el alimento, etc, y suelen infectar al animal a través del contacto con estos materiales. En esta categoría se encuentran mayoritariamente coliformes y estreptococos ambientales, además de especies pertenecientes al género *Bacillus*. Los microorganismos oportunistas como algunas bacterias del género *Staphylococcus*, se encuentran de manera ubicua tanto en la piel de los animales como en la piel de las personas. Y por último, los agentes contagiosos como *Streptococcus agalactiae*, *Staphylococcus aureus* y *Mycoplasma spp.* tienen su hábitat natural en la glándula mamaria infectada, por lo que el contagio se produce sobre todo de oveja infectada a oveja sana en el momento del ordeño a través de la máquina o de las manos contaminadas del ordeñador, que pueden actuar como reservorios de los agentes patógenos.

En ovejas, el patógeno que más se asocia a la aparición de las mastitis clínicas es *S. aureus* (20-60%) y en el caso de las mastitis subclínicas son los ECN los que aparecen con más frecuencia (30-95%), seguidos de *S. aureus* (3-37%) que son aisladas mayormente de infecciones crónicas. Estreptococos, *E. coli* y corinebacterias son menos frecuentes (Gonzalo *et al.*, 2002; Bergonier y Berthelot, 2003). En las mastitis subclínicas, los ECN son microorganismos oportunistas y se encuentran presentes en el entorno de ordeño, el equipo y la superficie de los pezones, causando mastitis infecciosa cuando alcanzan el canal del pezón (Radostits *et al.*, 2007), siendo el ECN que se encuentra con mayor frecuencia *S. epidermidis* (Pilipčincová *et al.*, 2010; Queiroga, 2017).

S. aureus secreta toxinas que contribuyen a la severidad de la sintomatología de la mastitis y juegan un papel importante en enfermedades alimentarias incluso con leche pasteurizada ya que estas enterotoxinas son termoestables (Contreras *et al.*, 2007).

Algunos lentivirus, como el Maedi Visna, también pueden provocar mamitis clínicas con induración de la glándula mamaria y subclínicas, con elevación de RCS y disminución de la producción (Menzies y Ramanoon, 2001; Kalogianni *et al.*, 2025).

También se han atribuido casos de mamitis a hongos del género *Aspergillus sp.* Las mamitis causadas por estos agentes son de tipo purulento o hemorrágico y provocan una alta mortalidad. Suelen aparecer de manera esporádica y se asocian al uso de cánulas vía intracisternal para el tratamiento antibiótico de una manera higiénicamente deficiente (Gancedo *et al.*, 2000)

3. CAMBIOS EN LA PRODUCCIÓN Y COMPOSICIÓN DE LA LECHE DERIVADOS DE LA MAMITIS

Como consecuencia del daño en el tejido glandular y de la alteración en la permeabilidad de las membranas que ocurren durante la mamitis se produce una disminución de la capacidad de síntesis y un incremento de los mecanismos de filtración, que provoca una disminución en la producción de leche y modificaciones en la composición de la misma (Kitchen, 1981).

3.1.1. Producción

El proceso inflamatorio produce la degeneración de células alveolares, que son sustituidas por tejido conectivo no funcional, provocando la disminución o el cese de la actividad sintética y secretora.

Distintos autores han estudiado que la respuesta inflamatoria ante una infección intramamaria provoca una disminución en la producción de leche tanto en vacas (Leitner *et al.*, 2011), como en cabras (Sánchez *et al.*, 1994; Martínez Navalón, 2000) y ovejas (Leitner *et al.*, 2004a, Martí-De Olives *et al.*, 2013).

En el ganado caprino, Leitner *et al.* (2004b) observaron que la cantidad de leche producida por las glándulas infectadas (0,69 kg/ordeño) fue significativamente menor que la de las que no lo estaban (0,98 kg/ordeño). En ovino, Leitner *et al.* (2004a) encontraron resultados similares, en los que la producción de las glándulas sanas fue

significativamente mayor que la de las que presentaban infección (0,76 frente a 0,36 kg/ordeño). Estos resultados corroboran lo obtenido también por Leiter *et al.* (2003) en el que la producción de leche de ovejas con las dos glándulas sanas fue algo mayor que la de ovejas con solo la glándula infectada, y ambas fueron significativamente más altas que la producción de las ovejas con las dos glándulas infectadas (2,88; 2,80 y 1,81 kg/día, respectivamente).

Silanikove *et al.* (2006) observaron que en el ganado ovino se producían una mayor disminución en la producción de leche que en el caprino debido a las mamitis subclínicas, lo que corrobora lo descrito por Leitner *et al.* (2004c), al observar que las pérdidas en la producción debido a la mamitis eran más acusadas en ovejas que en cabras. En ovejas se detectaron variaciones significativas entre las glándulas que no presentaban infección, con las que sólo tenían una glándula infectada y las que tenían las dos glándulas infectadas (2,05; 1,78 y 1,44 kg/día, respectivamente). En cabras no se detectaron diferencias estadísticamente significativas entre las que tenían las dos glándulas sanas y las que tenían una glándula infectada, pero ambas presentaron diferencias con las que tenían las dos glándulas infectadas, registrando valores de 2,68, 2,68 y 2,42 kg/día, respectivamente. Se ha descrito que, si la infección se produce en las dos glándulas mamarias, la pérdida en la producción de leche es mayor que cuando sólo se encuentra una glándula afectada ya que la sana compensa la pérdida con una mayor producción (Leitner *et al.*, 2003), sin embargo, la compensación es menor en ovejas que en cabras.

Martí-De Olives *et al.* (2013) observaron en ganado ovino que la pérdida individual de producción de leche en las ovejas infectadas en una sola glándula fue del 15% durante las 7 semanas posteriores a la infección, y la glándula no infectada produjo un 6,6% más de leche para compensar la pérdida de producción de la glándula infectada. También observaron que el descenso en la producción en los animales infectados desde la primera semana postparto fue del 17%, por lo que concluyeron que el efecto de la mamitis sobre la producción de leche es más grave si ocurre al principio de la fase de lactación, lo cual concuerda con lo obtenido por Santos *et al.* (2004) en vacas.

Existen diversos estudios que demuestran la existencia de una correlación negativa entre el aumento del RCS y la producción de leche. Mavrogenis *et al.* (1995) observó en el ganado ovino que la producción de leche disminuía en 18 g diarios si el RCS era de 500×10^3 cel/mL. Gonzalo *et al.* (2002) también describieron que existía dicha correlación negativa, lo cual fue corroborado por Leitner *et al.* (2003). Albenzio *et al.* (2004)

describieron una disminución del 47% en la producción cuando los valores de RCS eran superiores a 1×10^6 cel/mL.

3.1.2. Composición

La leche producida por animales infectados se caracteriza por algunas alteraciones de la composición química y propiedades físico-químicas (Bianchi *et al.*, 2004; Le Maréchal *et al.*, 2011). Estas modificaciones en la constitución de la leche se asocian con alteraciones del sabor y la textura en el queso (Le Maréchal *et al.*, 2011). Debido a la alteración de la permeabilidad de las membranas se produce un paso a la leche de componentes del plasma sanguíneo que no sucede en las glándulas sanas. Las lipasas y las proteasas se encargan de acelerar la descomposición de la grasa y la proteína (respectivamente) de la leche y la plasmina produce la degradación de la caseína (Leitner *et al.*, 2004a). En la leche con niveles elevados de RCS disminuye la cantidad de lactosa, se produce un cambio en la proporción de minerales y en las concentraciones de algunas vitaminas hidrosolubles (Caballero-Villalobos *et al.*, 2015; Paschino *et al.*, 2020). Martí de Olives *et al.* (2015) detectaron que el aumento de RCS tiene relación con modificaciones en la constitución de la leche, viendo que a partir de 500×10^3 cel/mL había un aumento en la proteólisis. En la tabla 3 podemos encontrar de qué manera varía la composición de la leche de animales con mamitis, según distintos autores.

Tabla 3. Variación (%) de la composición de la leche de oveja con mamitis respecto a las sanas.

	Grasa	Proteína total	Caseínas	Proteínas suero	Lactosa
Martins <i>et al.</i> (2013)	+9	-4	-	-	-2
Martí-de Olives <i>et al.</i> (2013)	+2	+6	NS	+15	-7
Caballero-Villalobos <i>et al.</i> (2015)	-1	NS	-	-	-2
Rovai <i>et al.</i> (2015)	NS	-18	NS	-	-11
Martí-de Olives <i>et al.</i> (2015)	NS	NS	NS	NS	-4
Paschino <i>et al.</i> (2020)	+4	+5	+4	-	-4
Kalogianni <i>et al.</i> (2025)	-6	-8	-	-	-8

Ante una infección y un aumento en el RCS se encuentran diferentes variaciones para algunos parámetros:

- Grasa: se producirá un aumento o una disminución de este parámetro en función de cómo sea la reducción de la producción de leche, ya que puede verse afectada por un efecto de concentración o de dilución (Burriel, 1997). Mientras algunos autores observan un descenso en el porcentaje graso en leche con valores altos de RCS (Jaeggi *et al.*, 2003; Revilla *et al.*, 2007), otros muestran que el porcentaje de grasa no se ve afectado por el RCS (Summer *et al.*, 2012; Martí de Olives *et al.*, 2013). Leitner *et al.* (2004d) en caprino, obtuvieron valores de 37,5 g/l para la leche obtenida de animales sanos y de 42 g/l para la de las glándulas que presentaban infección, aunque las diferencias observadas no resultaron significativas. Martins *et al.* (2013) describieron un aumento en los niveles de grasa en glándulas con mamitis: 5,68% en animales sanos, 6,17% en glándulas con mamitis subclínica y 7,12% en glándulas con mamitis clínica. Esto puede deberse a que al haber una reducción en la producción de leche se produce un efecto de concentración, tanto de la cantidad de grasa como de otros componentes (Burriel, 1997; Leitner *et al.*, 2003).

- Proteínas: de manera similar al del porcentaje graso, se encuentran diferentes resultados para la concentración de proteínas. Algunos autores mostraron que elevados RCS suponían un aumento en la cantidad de proteínas (Albenzio *et al.*, 2004; Bianchi *et al.*, 2004). En cambio, otros investigadores detectaron resultados opuestos (Jaeggi *et al.*, 2003; Fragkou, 2008) y otros no encontraron diferencias significativas (Albenzio *et al.*, 2005; Martí de Olives, 2005). Leitner *et al.* (2004d) en caprino, obtuvieron valores inferiores de proteínas (39,1 g/l) en la leche producida por animales sanos que en la de las infectadas (39,9 g/l). Algunos autores argumentaron que el aumento de proteínas puede deberse al efecto de concentración por la reducción en la producción (Burriel *et al.*, 1997). Otros consideraron que puede producirse una compensación de la disminución en la cantidad real de proteínas debido al incremento de la permeabilidad de la barrera epitelial secretora mamaria, que hace que aumente el flujo desde el torrente sanguíneo hacia la leche de proteínas relacionadas con la inflamación (Pirisi *et al.*, 2000; Bianchi *et al.*, 2004). Martí de Olives *et al.* (2013), obtuvieron un porcentaje superior de proteína en glándulas infectadas que en sus colaterales sanas. También observaron una disminución en la relación entre caseína y proteínas totales, junto con un aumento

notable de las proteínas séricas, considerando que podía ser debido al incremento en la capacidad de filtración entre sangre y leche que acompaña a la infección.

- Lactosa: En general, los trabajos de investigación sobre el tema concluyen que, durante la mamitis se observa un descenso en los niveles de lactosa. Esta disminución, puede ser debida por tres motivos: por un lado, a una menor producción de lactosa, como consecuencia de una reducción en la capacidad de síntesis del tejido dañado (Burriel, 1997). Por otro lado, una producción menor también puede deberse a que hay una menor disponibilidad de glucosa, que es su precursor, como consecuencia de la competencia por la energía entre las células secretoras y las células fagocíticas (Rulquin, 1997, Vivar-Quintana *et al.*, 2006). Y por último, los valores de la lactosa también pueden disminuir como consecuencia de su difusión hacia el medio intersticial a causa de la rotura de las membranas. Varios investigadores detectaron un incremento en el valor del pH de la leche en animales enfermos (Revilla *et al.*, 2007 y Lurueña, 2010), debido a que durante un proceso de mamitis hay una disminución en la producción de lactosa (Pirisi *et al.*, 2000; Revilla *et al.*, 2007), lo que conlleva una menor formación de ácido láctico por los agentes patógenos. Leitner *et al.* (2003) observaron una disminución en el porcentaje de lactosa (5,30% frente a 4,72%) al comparar leche de glándulas sanas e infectadas. Resultados similares obtuvieron Bianchi *et al.* (2004) y Martins *et al.* (2013). Otros estudios observaron que existía una correlación negativa entre el RCS y la producción de lactosa (Antonič *et al.*, 2013; Martí de Olives *et al.*, 2015).

- Contenido mineral: En la glándula mamaria existen diferentes barreras que controlan el paso de iones entre la leche y la sangre. Cuando un animal sufre una infección intramamaria, las citadas barreras se ven alteradas a causa del proceso inflamatorio, lo cual produce una modificación en la concentración de distintos iones. La relación del aumento de RCS en la leche de oveja con el contenido mineral no están claros (Le Maréchal *et al.*, 2011). Con respecto al fósforo, Pirisi *et al.* (2000) y Bianchi *et al.* (2004) no observaron variaciones de contenido de fósforo relacionadas con el incremento de RCS. Sin embargo, Summer *et al.* (2012) sí describieron valores de fósforo superiores en leche procedente de glándulas sanas (138,8 mg/100g) con respecto a la procedente de glándulas con mamitis (131,3 mg/100g). En cuanto al calcio, Pirisi *et al.* (2000) no observaron

variaciones relacionadas con el aumento de RCS, mientras que Bianchi *et al.* (2004) encontraron un aumento del contenido de calcio, al igual que Summer *et al.* (2012), que registraron valores de 157,28 mg/100g en leche de animales sanos frente a 170.48 mg/100g en la leche de glándulas con mamitis. También hay diferencias si hablamos de los cloruros, ya que algunos autores como Hamed *et al.* (1993) encontraron un aumento en la cantidad de cloruros en las glándulas con infección frente a las que no estaban infectadas (1520 y 1300 mg/kg respectivamente), al igual que Santos *et al.* (2007) que registraron valores de 136,7 mEq/L en glándulas infectadas y de 103,45 mEq/L en glándulas sanas, y que Summer *et al.* (2012), que encontraron una disminución en los mismos en la leche de las glándulas sanas (93,17 mg/100g frente a 103,57 mg/100g). Sin embargo, Bianchi *et al.* (2004), observaron un pequeño aumento de los cloruros durante la infección que no fue significativo. Por lo que respecta al sodio y al potasio Burriel (1997) observó un aumento en la cantidad de sodio (14,7 mmol/L en glándulas sanas frente 26,9 mmol/L en glándulas infectadas) y un descenso en la concentración de potasio (36,3 mmol/L en glándulas sanas y 34,9 mmol/L en las infectadas).

- Enzimas: ante una mamitis, la concentración de enzimas de la leche puede aumentar, por lo que su actividad degradativa también aumentará produciendo alteraciones en las características organolépticas de la leche y una disminución en su rendimiento tecnológico. Algunas de estas enzimas como la lipasa, fosfatasa, lactatodeshidrogenasa, lisozima, plasmina (Harmon, 1994), peroxidasa, xantina oxidasa (Korhonen y Kaartinen, 1995), catalasa y NAGasa (ver apartado 4.2 de métodos indirectos de diagnóstico de mamitis) aumentan cuando lo hace el RCS, por lo que pueden ser consideradas como marcadores del estado sanitario de la leche. A continuación, se describen algunas de las enzimas que no se citan en los apartados 4.2 y 5:

- Lisozima: se encarga de destruir las bacterias que han sido fagocitadas por los PMN. Aunque esta enzima se asocia a los leucocitos, se ha encontrado en el suero de la leche.
- Lactoferrina: posee actividad antimicrobiana y es producida por los lactocitos y los leucocitos polimorfonucleares. En el ganado vacuno diferentes autores han observado un incremento en los valores de lactoferrina en la leche

procedente de glándulas mamíticas y con RCS elevados (Kawai *et al.*, 1999; Hagiwara *et al.*, 2003).

- Lactoperoxidasa: aunque está presente en la leche, también puede ser producida por los leucocitos. Es utilizada como indicador de una correcta pasteurización de la leche. Su propiedad antimicrobiana hace que sea considerada como una alternativa para la conservación de leche cruda en áreas con clima cálido y donde no es posible utilizar el sistema de refrigeración convencional por razones técnicas y / o económicas (Seifu *et al.*, 2007).
- Lipasa: esta enzima actúa sobre la grasa hidrolizando los triglicéridos, lo que hace que se liberen los ácidos grasos que son los responsables de la aparición de sabores anormales en los productos y hacen que tengan un menor tiempo de conservación. Es excretada principalmente tras la lisis de las células somáticas, por lo que sus niveles aumentan cuando el animal sufre una mamitis (Li *et al.*, 2014).
- Fosfatasa: dentro de las fosfatasas encontramos una enzima ácida y una alcalina. Su actividad disminuye al pasteurizar la leche, por lo que es usada para comprobar si la pasteurización ha sido eficaz. Hay varios estudios tanto en vaca (Babaei *et al.*, 2007) como en cabra (Morgan, 2000) que demuestran que la actividad de esta enzima está aumentada durante la mamitis.
- Plasmina: se encuentra en la sangre y debido al aumento de permeabilidad que ocurre durante la mamitis, sus niveles aumentan en la leche. Esta enzima presenta actividad proteolítica y degrada la caseína (Pyörälä, 2003).

3.1.3. Rendimiento quesero

Estudios previos en ovino describieron que la mamitis subclínica afecta en gran medida tanto a la producción de leche (Gonzalo *et al.*, 2002; Leitner *et al.*, 2008; Giadinis *et al.*, 2012) como a la elaboración de quesos (Leitner *et al.*, 2004a; Martí-De Olives *et al.*, 2011).

En el ganado ovino, algunos autores mostraron que la leche de las glándulas enfermas presentaba menor cantidad de lactosa y niveles más altos de plasmina, que es la responsable de la degradación de proteínas. La inflamación de la glándula también resultó en un mayor tiempo de coagulación y peor firmeza de la cuajada (Bianchi *et al.*, 2004). Summer *et al.* (2012) comprobaron que cuando la leche presentaba valores

inferiores a 265×10^3 cel/mL era de mejor calidad, por lo que era una leche más apropiada para la producción de queso.

Los parámetros tecnológicos de la leche están relacionados con el RCS. Hay diversos estudios que muestran que la leche de oveja con $RCS > 10^6$ cel/mL tardan más tiempo en coagular y obtener la firmeza correcta de la cuajada que otras leches con $RCS < 500.000$ cel/mL (Albenzio *et al.*, 2004; Revilla *et al.*, 2007; Martí de Olives *et al.*, 2015). Algunos autores describieron que la firmeza de la cuajada presenta una correlación negativa con el RCS (Bianchi *et al.*, 2004; Jaramillo, 2007 y Lurueña, 2010).

Otros estudios como el de Merin *et al.* (2004) obtuvieron que, tanto en ovino como en caprino, la producción de cuajada era menor si la leche procedía de animales infectados con ECN que si provenía de glándulas sanas, lo cual podría ser debido a que en la leche secretada por glándulas con mamitis la concentración de caseínas era menor.

El ganado ovino es más sensible que el caprino a las infecciones subclínicas (Silanikove *et al.*, 2010). Esto se ve reflejado por una mayor reducción en la producción y en el rendimiento de la leche en la oveja que en la cabra cuando son expuestas a la misma infección y tienen similares RCS (Leitner *et al.*, 2004b; Leitner *et al.*, 2011). Otros autores más recientes demostraron en sus investigaciones el efecto negativo de las mamitis subclínicas en la calidad del queso de oveja tanto fresco como curado (Rovai *et al.*, 2015). El almacenamiento de la leche obtenida de ovejas con infección intramamaria causó un mayor deterioro de su calidad, que se manifestó con un menor rendimiento y calidad del queso Manchego (Abdelgawad *et al.*, 2016).

4. MÉTODOS DE DIAGNÓSTICO DE MAMITIS

La detección temprana de la enfermedad es de gran importancia (Mavrogianni *et al.*, 2011) ya que cuanto antes se diagnostique más efectivo será el tratamiento, y menor será el daño producido a la glándula y la probabilidad de transmitir la enfermedad a los animales sanos.

El diagnóstico de las mamitis clínicas es más sencillo ya que los cambios en el animal, la ubre y/o la leche se pueden observar externamente. En estos casos se observa al animal con una alteración del estado general, con apatía, pérdida de apetito y fiebre. La glándula mamaria estará inflamada, enrojecida, caliente y dolorosa, y la leche también se

va a ver afectada pudiéndose apreciar cambios en su coloración y viscosidad. Todos estos síntomas variarán en función de la gravedad de la enfermedad.

En el curso de las subclínicas, su detección está basada en el diagnóstico directo de la infección mediante cultivo bacteriológico o en la detección indirecta de la reacción inflamatoria de la glándula, ya que no se van a producir los cambios externos que encontramos en las clínicas.

Debido a que algunas variables pueden verse modificadas, además de por la infección por otras causas como el estado de lactación, el número de parto, momento del ordeño, la edad del animal, entre otros, hay autores que opinan que el uso de la combinación de diferentes métodos de detección podría mejorar la fiabilidad sobre el diagnóstico de la enfermedad (Köhler *et al.*, 2003).

Un buen método de detección de mamitis debe ser económico, rápido, fiable, sencillo, que se pueda aplicar a nivel de granja, y además, tener una alta especificidad y sensibilidad. Una alta sensibilidad refleja una mayor capacidad para detectar correctamente a los animales enfermos, reduciendo así los falsos negativos. Una alta especificidad indica que la prueba diagnóstica tiene una alta capacidad para identificar correctamente a los animales sanos, minimizando los falsos positivos.

4.1. MÉTODOS DIRECTOS

Estos métodos permiten el diagnóstico de la enfermedad mediante la detección de microorganismos patógenos en la leche y presentan la ventaja de poder realizar un tratamiento específico para el agente que provoca la mamitis (Mavrogianni *et al.*, 2011)

a) Cultivo bacteriológico

Puede ser considerado como uno de los mejores métodos de diagnóstico, pero también presenta varias desventajas. Por un lado, el tiempo requerido para obtener los resultados es bastante grande, y por otro, la necesidad de personal cualificado para su realización y que la toma muestras de todos los animales puede resultar bastante caro, todo ello hace que no sea un método muy útil a nivel de campo (McDougall *et al.*, 2001; Souza *et al.*, 2012).

Aunque este método generalmente presenta una alta fiabilidad, también tiene algunos problemas de sensibilidad, ya que se pueden encontrar algunos resultados falsos negativos debido a problemas con los medios de cultivo, de la dificultad de aislar algunos agentes, de la escasa e intermitente excreción del agente patógeno, de la existencia de una

antibioterapia anterior o de la presencia de moléculas antimicrobianas producidas por el sistema inmune del animal como la lisozima, la ferritina, la lactoferrina y los péptidos microbianos (Rainard y Riollot, 2006; Walker *et al.*, 2011; Souza *et al.*, 2012).

Este método, también tiene problemas de especificidad, por el crecimiento de bacterias presentes en el medio ambiente o comensales, o por asignaciones erróneas de especies en las pruebas de identificación (Plumed-Ferrer *et al.*, 2013). Se ha dado el caso de detección de patógenos en glándulas sanas de manera ocasional, por lo que sólo habría que considerar verdaderos positivos cuando se detecte el mismo patógeno al menos en dos ocasiones consecutivas y además estos provoquen un aumento del RCS (Sánchez *et al.*, 1996).

Por todo esto se usan más frecuentemente métodos indirectos que detectan la reacción inflamatoria, ya que además de ser más baratos, son también más rápidos (Nyman *et al.*, 2014).

b) Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

La PCR detecta el material genético (ADN o ARN) de los patógenos que provocan la mamitis. Es un método de detección más rápido y sensible que el cultivo bacteriológico. En el ganado vacuno, Keane *et al.* (2013) detectaron la presencia de patógenos en un mayor número de muestras de leche con la PCR (92%) que mediante el cultivo bacteriano (70 %). En ovejas, Zadocks *et al.* (2014) al comparar la eficacia del cultivo bacteriológico y la PCR observaron una coincidencia del 72% en los diagnósticos, aunque la PCR mostró una mayor sensibilidad en muestras con baja carga bacteriana, el cultivo bacteriológico permitió identificar una mayor diversidad de especies.

Diana *et al.* (2024) desarrollaron para vacas una técnica molecular basada en la PCR digital en gotas dúplex con la que se obtuvo una mayor sensibilidad que con la PCR convencional para diagnosticar *S.uberis* y *S.dysgalactiae* (80-100% vs. 40-55%). Para ambos patógenos se obtuvo un 100% de especificidad con las dos técnicas. Estos datos muestran que la PCR digital en gotas puede resultar muy efectiva para analizar muestras con una carga bacteriana baja.

Entre las limitaciones que presenta la PCR, se encuentra la necesidad de equipos especializados, su alto coste, riesgo elevado de contaminación y que no es capaz de diferenciar si el material genético proviene de células viables o no, por lo que podría necesitar análisis adicional para establecer la importancia clínica de sus resultados (Koskinen *et al.*, 2010).

4.2. MÉTODOS INDIRECTOS

Estos métodos detectan la enfermedad gracias a los cambios que se producen en la leche como consecuencia de la reacción inflamatoria que se produce durante la mastitis, destacando los cambios a nivel celular y modificaciones en la composición de la leche.

a) Recuento de células somáticas (RCS)

Es uno de los métodos más usados para la detección de la reacción inflamatoria producida en la mastitis, ya que suele ir acompañada por un aumento de células inmunes de la sangre y en menor medida de células epiteliales del tejido mamario en la leche (Kelly *et al.*, 2011).

Debido a la existencia de otros factores no infecciosos que provocan variación en el RCS como la edad, la raza, estado fisiológico del animal, el estado de lactación, el número de parto, el momento del ordeño, fracción de ordeño, etc. (Gonzalo *et al.*, 1994; Arias *et al.*, 2012) en el ganado ovino y caprino los umbrales para la detección de la infección todavía no estén bien definidos, lo que hace que este método no esté tan claramente relacionado con el estado sanitario en ovejas y cabras como lo está en vacas (Raynal-Ljutovac *et al.*, 2007; Souza *et al.*, 2012).

En cabras, Romero *et al.* (2012) describieron, tanto para las glándulas sanas como para las que presentaban infección, un aumento en el RCS conforme avanzaba el ordeño, siendo los valores más altos en la fracción de apurado. Usando como umbral el valor de 300×10^3 cel/mL en la leche de apurado, estos autores obtuvieron una sensibilidad del 85% y una especificidad del 65% en la detección de la enfermedad. Persson *et al.* (2014) obtuvieron en animales sanos un mayor valor del RCS en la lactación tardía (día 223 de media), que en la lactación media (día 117 de media) y temprana (día 40 de media), cuyos valores fueron de 449×10^3 cel/mL, 190×10^3 cel/mL y de 137×10^3 cel/mL, respectivamente. Stuhr *et al.* (2013) mostraron que, aunque el valor del RCS se vio afectado por factores como el estado de lactación, existía una diferencia significativa entre los valores del RCS presentes en la leche secretada por glándulas sanas y de las que tenían mastitis. Las glándulas infectadas con patógenos mayores presentaron valores más altos que las que lo estaban con corinebacterias o ECN, y estas a su vez presentaron valores más elevados que las glándulas sanas.

En ovejas, Gonzalo *et al.* (2002) observaron que el RCS variaba en función del rebaño, del agente causante de la infección y del estado de lactación. Obtuvieron un RCS

en glándulas sanas de 77×10^3 cel/mL, en glándulas infectadas por patógenos menores un valor de 131×10^3 cel/mL, en glándulas infectadas por ECN sensibles a la novobiocina 1.005×10^3 cel/mL, y en glándulas infectadas por patógenos mayores 1.841×10^3 cel/mL. También Arias *et al.* (2012), encontraron variaciones según la edad del animal, la cantidad de crías, el estado de lactación, el momento del día en el que se realizaba el ordeño y según la estación del año en la que se encontraban. Leitner *et al.* (2001) obtuvieron un valor de RCS en la leche procedente de las glándulas sanas de 321×10^3 cel/mL y no cambió significativamente durante la lactación. En las glándulas infectadas con ECN fue de 1.371×10^3 cel/mL en la primera muestra y aumentó a 2.129×10^3 cel/mL en el secado y en las glándulas infectadas con estreptococos el valor se mantuvo en 2×10^6 cel/mL durante toda la lactación. El mayor RCS en las glándulas infectadas con ECN contrastó con el RCS más moderado encontrado en las vacas infectadas de manera similar, lo que podría sugerir que la glándula mamaria ovina presenta una mayor susceptibilidad y una respuesta inmune aumentada contra este grupo de bacterias. Leitner *et al.* (2004a) también registraron valores de RCS más elevados en las glándulas infectadas con ECN que en las glándulas sanas (2.358×10^3 cel/mL y 270×10^3 cel/mL respectivamente). Romero *et al.* (2017) detectaron que tanto la infección del tejido mamario, como el número y estado de lactación, y el momento del ordeño también afectaban al RCS de la leche.

En vacuno, en general, se considera que valores superiores a 250×10^3 cel/mL indican la presencia de mamitis, pero en ovino este valor varía en función de las referencias consultadas. Gran cantidad de autores han intentado establecer umbrales en la oveja a lo largo del tiempo, pero debido a los diferentes factores de variación no infecciosos hay una gran variabilidad de estos valores.

Los umbrales propuestos en ovejas oscilan entre 200×10^3 y 1,5 millones de cel/mL, pero en la mayoría de los casos se indican valores por debajo de las 500×10^3 cel/mL (Bergonier *et al.*, 2003; Contreras *et al.*, 2007; Souza *et al.*, 2012). Se ha sugerido que valores inferiores a 500×10^3 cel/mL indican ausencia de mamitis y valores superiores a 1×10^6 cel/mL indican su presencia de manera fiable, entre estos dos valores, se requeriría un examen bacteriológico de la leche para confirmar la mamitis subclínica (Berthelot *et al.*, 2006; Fragkou *et al.*, 2014; Gelasakis *et al.*, 2015).

Por otro lado, otros autores indican que RCS mayores de 400×10^3 cel/mL en ovino tienen aproximadamente 7 veces más probabilidades de tener una mamitis subclínica que animales con un RCS por debajo de ese umbral, por lo que este valor podría ser utilizado

como detector de mastitis subclínicas (Hussein *et al.*, 2015). Las Heras *et al.* (2002) estudiaron la evolución de los valores de sensibilidad y especificidad para distintos posibles umbrales para el RCS, y observaron que, sin considerar el estado de lactación, las dos se cruzaron en el valor de 400×10^3 cel/mL. Este valor mostró una precisión del 82%, con una tasa de falsa positividad del 13% y de falsa negatividad del 6%. Burriel (1997), concluyó que un umbral de 400×10^3 cel/mL debía utilizarse como indicador de una posible mastitis subclínica causada por estafilococos coagulasa negativos, mientras que valores de 600×10^3 cel/mL podían indicar un problema más grave.

Los métodos más usados para determinar el RCS en la leche son: el método Fossomatic, el Coulter counter y la espectroscopia del infrarrojo cercano (NIR). El método Fossomatic consiste en la coloración del material genético de las células somáticas utilizando bromuro de etidio, generando un compuesto que al ser irradiado por luz azul emite una fluorescencia roja que es registrada por el equipo. El método Coulter-Counter realiza de manera electrónica un recuento de las partículas presentes en la leche. El método NIR se ha usado tanto para analizar la constitución de la leche como para la detección de mastitis, en el estudio realizado por Tsenkova *et al.* (2006) en vacuno se demostró que este método presentaba una alta exactitud.

Gonzalo *et al.* (2006) estudiaron en oveja el uso de un contador de células portátil (DCC, deLaval, Suecia) con el que se pueden realizar las mediciones del RCS en la explotación donde se encuentran los animales. Encontraron que, aunque el análisis directo de la leche no fue muy preciso como consecuencia de la cantidad de sólidos que se encuentran en la leche de oveja, los datos obtenidos sí eran correctos si se diluía la leche.

Hoy en día existen equipos para el ganado vacuno que pueden medir el RCS al mismo tiempo que el animal es ordeñado.

b) California mastitis test (CMT)

Este test nos da una idea de manera aproximada del número de células somáticas presentes en la leche en función del grado de gelificación de la muestra. A mayor cantidad de células, mayor es el grado de gelificación, ya que el detergente que se añade a la leche provoca la ruptura de las células y la liberación de distintos componentes de su interior haciendo que se forme la matriz gelatinosa. Tiene como ventaja que es un test fácil y rápido y que se puede usar a nivel de granja, pero presenta la desventaja, de que además de verse afectado por todos los factores que afectan al RCS, la interpretación de los resultados es subjetiva ya que pueden variar según la persona que realice la lectura y no

permite saber el número exacto de células somáticas, sino únicamente clasificar la enfermedad en 4 niveles según la gravedad (Fragkou *et al.*, 2014).

Aunque hay estudios que consideraron el CMT útil para la detección de mamitis (Karzis *et al.*, 2007; Petzer *et al.*, 2008), hay otros autores que observaron en cabras que más del 20% de las glándulas infectadas con ECN dieron resultados negativos en el CMT, y que el 25% de las glándulas sanas mostraron resultados positivos en dicho test (Schaeren y Maurer, 2006), por lo que consideraron que este método tenía un valor limitado para esta especie.

c) Conductividad eléctrica (CE)

La conductividad eléctrica mide la facilidad que tiene un material para conducir la corriente eléctrica. La CE depende en su mayor parte del contenido de las sales de la leche, del tipo de sales y de su manera de interaccionar (Schulz y Sydow, 1957), por lo que las sales tendrán más influencia sobre la CE que otros elementos que constituyen la leche como la grasa, la proteína y la lactosa (Ruegg *et al.*, 1980).

Es uno de los métodos más utilizados para el diagnóstico de mamitis en vacuno. Esta prueba detecta el aumento de la CE de la leche que aparece en las mamitis debido a un cambio en su concentración de iones como el sodio, potasio y cloro. Este cambio es causado por una alteración en la permeabilidad entre la sangre y la leche que se produce como consecuencia del daño que la mamitis provoca en el tejido mamario (Hamann y Zeconi, 1998). La variación del contenido electrolítico de la leche, es una de las alteraciones que se dan de manera más temprana en el desarrollo de una mamitis, y por eso, es uno de los métodos más importantes.

Una gran ventaja de este método es que se puede medir la CE de cada glándula en el momento del ordeño a nivel de granja (Romero *et al.*, 2012), lo que va a permitir detectar de manera temprana la presencia de la enfermedad en alguna de las glándulas de una manera sencilla y económica. Estos sistemas electrónicos suelen funcionar mediante unos electrodos incorporados a la unidad de ordeño, que miden el parámetro y lo envía a un ordenador que lo convierte en una señal legible. Estos sistemas automáticos son muy usados en el ganado vacuno, pero todavía no están muy extendidos a nivel de granja en caprino y ovino (Tangorra *et al.*, 2010), aunque ya hay investigadores que han empleado prototipos y algoritmos que incluyen la CE para el diagnóstico de mamitis en caprino (Romero *et al.*, 2012; Zaninelli *et al.*, 2015). Los valores de sensibilidad y especificidad de este método de detección varían mucho en función del tipo de algoritmo empleado y

la clase de mamitis que se quiera detectar (Zecconi *et al.*, 2004; Cavero *et al.*, 2007), ya que no existe un umbral estándar que nos permita clasificar a los animales enfermos (Dohoo *et al.*, 2011).

Los valores de la CE en la leche de vaca de animales sanos se encuentran entre 4,0 y 6,0 mS/cm (Norberg *et al.*, 2004), pero estos valores aumentan cuando la leche procede de animales infectados, ya que presenta una mayor capacidad para conducir la corriente eléctrica como consecuencia del aumento de los iones Na^+ y Cl^- y a la disminución de la lactosa y de los iones K^+ (Kitchen, 1981).

En oveja, Caria *et al.* (2016), observaron valores de 4,73 mS/cm. Peris *et al.* (1989) registraron valores de 4,4 mS/cm para leche procedente de animales sanos y entre 9,5-10,5 mS/cm para la secretada por glándulas con mamitis. La CE no sólo se ve modificada por la infección, sino que hay una serie de factores como el momento y número de lactación, ordeño, fracción de la leche o el tipo de patógeno, el estro, etc. que pueden provocar cambios de la CE, y por ello no se puede aplicar un umbral común a todos los animales. Para obtener mejores resultados, en cabra se observó que sería necesario realizar mediciones diarias de la CE usando algoritmos que incluyan otros factores de variación como la variación individual (Díaz *et al.*, 2012). Romero *et al.* (2017) encontraron que tanto la infección de la glándula, la sesión del ordeño, y el momento y número de lactación influyeron significativamente en las variaciones de la CE, siendo los valores más altos de CE a las dos semanas postparto.

d) Variación en la composición y el pH de la leche

La mamitis produce variación en los niveles de distintos elementos presentes en la leche, pues se produce un daño tisular y una disminución de la capacidad sintética de las células secretoras. Debido a esto y a que la síntesis de lactosa se reduce, su concentración puede usarse como diagnóstico de la enfermedad (Pyörälä 2003), aunque según otros autores, su porcentaje de disminución es relativamente pequeño, lo que podría comprometer su uso para la detección de mamitis (Berning y Shook, 1992; Hamann y Zecconi, 1998).

Los cloruros también se han estudiado como posibles detectores de mamitis. En vacas, Zafalon *et al.* (2005) empleando un punto de incremento de cloruros superior al 16%, obtuvieron una sensibilidad del 68,2% y una especificidad del 77,7% para las muestras con *S. aureus* y una sensibilidad del 78,3% y una especificidad del 63,6%, para las que se infectaron con corinebacterias.

Las mamitis también alteran la relación entre el K^+ y el Na^+ , y así algunos autores como Díaz *et al.* (2012) observaron en caprino un aumento en la proporción entre iones sodio y potasio que presentaban las glándulas infectadas.

El pH es un parámetro de la leche con valores entre 6,5 y 6,8 en glándulas sanas y que ha sido estudiado como posible método de diagnóstico de mamitis. La detección del pH puede realizarse a nivel de campo con tiras de papel indicador. Este método no es del todo fiable ya que hay multitud de factores, además de la mamitis, que alteran el pH de la leche. Romero *et al.* (2010) observaron en ganado caprino un incremento significativo del pH cuando la CE era superior a 6,2 mS/cm, aumentando también el RCS.

e) β -glucuronidasa

La β -glucuronidasa pertenece al grupo de hidrolasas y su actividad está relacionada con la respuesta inmune del cuerpo. Debido a que en sus inicios este método era considerado lento y muy poco sensible, la actividad de la β -glucuronidasa casi no se analizó en los primeros estudios (Kitchen y Middleton, 1976). Sin embargo, en 1986, Perdigon *et al.* (1986) comenzaron a ver el nivel de esta enzima como un parámetro muy sensible y muy efectivo para la detección de mamitis bovina.

Oliszewski *et al.* (2002) estudiaron los niveles de β -glucuronidasa en leche de cabra, apoyando su utilidad como enzima marcadora para el diagnóstico de mamitis y propusieron 15 U/l como valor límite de la actividad de la β -glucuronidasa para distinguir entre muestras de leche infectadas y no infectadas, usando un valor umbral de $1,3 \times 10^3$ cel/mL para el RCS como una referencia para el estado de infección. Larsen y Aulrich (2012) desarrollaron un método fluorométrico optimizado para una determinación más precisa de la β -glucuronidasa en la leche de rumiantes, revelando su factibilidad en línea con otros indicadores para la mamitis. Stuhr *et al.* (2013) observaron en el ganado caprino diferencias significativas en la actividad de la β -glucuronidasa al comparar leche de glándulas no infectadas con leche procedente de glándulas infectadas con diferentes tipos de patógenos. Los valores de las glándulas infectadas con patógenos mayores se diferenciaban altamente de los valores de las glándulas infectadas con ECN y de las glándulas sanas. En este estudio, tanto el estado infectivo de la glándula como el número de parto afectaron de manera significativa a los valores de la actividad de la enzima, sin encontrar diferencias significativas con el estado de lactación.

f) Fosfatasa alcalina

En ganado vacuno, Larsen *et al.* (2010) comprobaron que se producía un aumento en los valores de RCS y fosfatasa alcalina tras una infusión en la glándula mamaria de endotoxina de *E. coli*, aumento que ya se observaba a las 7h post infusión y se mantuvo durante los 5 días posteriores a la administración de la endotoxina. Nyman *et al.* (2014) no observaron variación en los valores de la fosfatasa alcalina causados por la infección intramamaria (643 U/L en las glándulas sanas vs 636 U/L en las glándulas con mamitis), pero sí obtuvieron que el valor de esta enzima estaba influenciado por la raza, el número de lactación (valores más altos en hembras en su primer o segundo parto), o por el estado de lactación (LDH aumentaba conforme lo hacían los días de lactancia).

Persson *et al.* (2014) observaron en animales sanos de ganado caprino, que el estado de lactación afectaba significativamente a la fosfatasa alcalina, este valor aumentaba al final de la lactación en comparación con la lactación temprana y media. En este sentido, obtuvieron un mayor valor en la lactación tardía (día 223 de media), que en la lactación media (día 117 de media) y temprana (día 40 de media), cuyos valores fueron de 72,5 U/l, 53,2 U/l y de 43,2 U/l, respectivamente

Katsoulos *et al.* (2010), demostraron tanto en ovino como en caprino que la actividad de la fosfatasa alcalina era significativamente mayor en la leche procedente de glándulas infectadas de manera subclínica que los valores de la que provenía del grupo de animales sanos (2773,43 U/l vs 2189 U/l en oveja y 311,13 U/l vs 137,24 U/l en cabra).

g) Lactato deshidrogenasa (LDH)

La LDH es una enzima cuyo valor aumenta durante la mamitis ya que es liberada por las células somáticas y por las células epiteliales que se dañan en el proceso inflamatorio (Babaei *et al.*, 2007). Diferentes autores han encontrado la LDH como una de las enzimas más fiables para el diagnóstico de la enfermedad tanto en vacas como en pequeños rumiantes.

Nyman *et al.* (2014) en el ganado vacuno obtuvieron diferencias significativas en los valores de la LDH causadas por la infección intramamaria, siendo más altos en las glándulas con mamitis (2,63 U/L) que en las glándulas sanas (1,73 U/L). Obtuvieron una correlación de 0,59 entre el Ln LDH y el Ln RCS, lo cual indica que podría ser un buen indicador de la mamitis. También observaron que distintos factores como el número y el estado de lactación o la estación, provocaban variación en los valores de LDH, encontrando los valores más altos en las hembras con más de 5 partos, al inicio y al final

de la lactación. Katsoulos *et al.* (2010), concluyeron que la actividad de la LDH era mejor indicador para la detección de mamitis que la de la fosfatasa alcalina y la de la aspartato aminotransferasa tanto en ovejas como en cabras. Encontraron que la actividad LDH era significativamente más alta en la leche de animales con mamitis subclínica que en la de animales sanos (350,42 U/l vs 120,91 U/l en oveja y 354,07 U/l vs 103,79 U/l en cabra). Considerando el valor de 197 U/l como punto de corte para la detección de la mamitis en oveja y 185 U/l en cabra, se obtuvo una sensibilidad y especificidad del 92,8% y 95,4% para ovino y del 98,2% y 96,3 % para caprino. Persson *et al.* (2014) observaron en animales sanos de ganado caprino, que al igual que pasaba con la fosfatasa, el estado de lactación también afectaba significativamente al valor de la LDH, aumentando al final de la lactación (día 223 de media) en comparación con la lactación media (día 117 de media) y temprana (día 40 de media) con valores de 7,7 U/l, 3,3 U/l y de 3,2 U/l, respectivamente.

h) Catelecidina

La catelecidina es una proteína inflamatoria implicada en la defensa inmune innata del huésped, que es liberada ante un estímulo microbiano por las células epiteliales mamarias y por los neutrófilos en la leche de los animales con mamitis, a menudo, incluso previamente a que aparezca la sintomatología clínica (Smolenski *et al.*, 2011; Addis *et al.*, 2013). Otra de las ventajas de la catelecidina es que es casi indetectable en la leche de animales sanos, a diferencia de otras proteínas antimicrobianas, y sus niveles aumentan rápida y significativamente sólo después de la exposición a un estímulo inflamatorio. Además, si no se establece una infección, los niveles de catelecidina disminuyen rápidamente a sus niveles basales (Saad y Ostensson, 1990; Sladek *et al.*, 2005; Smolenski *et al.*, 2011).

Addis *et al.* (2016) demostraron que estas proteínas podían ser unos buenos indicadores de la enfermedad en ovejas, observando que la cantidad de catelecidinas aumentaba con el incremento de los valores de RCS. Los grupos catelecidina negativos y catelecidina positivos mostraron una separación clara en relación con el RCS, con valores medios de 149×10^3 y 3.300×10^3 cel/mL, respectivamente. La sensibilidad y la especificidad del ELISA de catelecidina se evaluaron frente a 2 umbrales de RCS: con un umbral de RCS de 500×10^3 cel/mL, se obtuvo un 92,3 y 92,3% para el ELISA de catelecidina y un 89,0 y 94,9% para el RCS y con un umbral de RCS de 1×10^6 cel/mL, se obtuvo un 93,3 y 91,9% para el ELISA de catelecidina y un 80,0 y 97,1% para el RCS.

El uso de la catelicidina en la detección de mamitis también ha sido estudiado por otros investigadores en ganado vacuno (Ibeagha-Awemu *et al.*, 2010; Smolenski *et al.*, 2011) y en cabras (Brenaut *et al.*, 2014).

i) Proteínas de la fase aguda

El aumento de la permeabilidad que ocurre como consecuencia de la reacción inflamatoria en las mamitis provoca la liberación en la leche de muchas proteínas de fase aguda y la variación de sus concentraciones en la leche puede ser utilizada para la detección de mamitis. Las proteínas de fase aguda más utilizadas en la para la detección de la enfermedad son: Amiloide-A sérico, Haptoglobina, y Proteína C-Reactiva, ya que sufren un aumento más rápido y más pronunciado en la mayor parte de las especies. Los niveles del Amiloide-A sérico aumentan más rápidamente que el RCS, lo cual implica que podría resultar de utilidad en el diagnóstico temprano de la enfermedad (Whyte *et al.*, 2004). En ganado vacuno, las proteínas de fase aguda más sensibles son la Haptoglobina y el Amiloide-A sérico, que muestran un aumento sustancial en la respuesta a la inflamación aguda, ya que pueden llegar a aumentar más de 100 veces (Eckersall *et al.*, 1988; Boosman *et al.*, 1989). Utilizando valores umbral de 0,02 mg/mL para la Haptoglobina de leche y 0,55 µg/mL para el Amiloide-A sérico, ambas pruebas tenían una alta especificidad (100%) sin resultados falsos positivos, y una buena sensibilidad (86% y 93%) para el diagnóstico de mamitis (Eckersall *et al.*, 2001). Kalmus *et al.* (2013) obtuvieron valores de Amiloide-A y Haptoglobina más altos cuando los signos clínicos eran severos que cuando eran moderados o leves. Mamitis producidas por *E. coli* mostraron valores de 394,1 mg/L de Amiloide-A y de 575,4 mg/L de Haptoglobina, mientras que los valores obtenidos en infecciones con ECN fueron de 29,2 mg/L para el Amiloide-A y de 123 mg/L para la Haptoglobina.

Grönlund *et al.* (2003) detectaron en vacas que la Haptoglobina aumentaba en el suero de la sangre después de una infección con *S. aureus* (945,5 vs. 52,5 mg/L) y descendía cuando la infección se cronificaba a valores anteriores a que se produjera la infección (83,2 mg/L). Nielsen *et al.* (2004) observaron que los niveles de Haptoglobina aumentaban tanto en el suero sanguíneo como en la leche durante la mamitis. En la leche este aumento estaba directamente relacionado con el aumento del RCS, por lo que podría servir para indicar la gravedad de la enfermedad. Wenz *et al.* (2010) encontraron que los valores de Haptoglobina fueron más altos en la mamitis inducida por *E. coli* en comparación con la mamitis causada por estreptococos ambientales o ECN.

Para la determinación de las proteínas de la fase aguda pueden usarse métodos colorimétricos, que detectan una modificación del color que se produce como consecuencia de la actividad enzimática de las proteínas en algunos sustratos, e inmunológicos, basados en la interacción antígeno-anticuerpo. El método para la detección del Amiloide-A sérico es mediante una prueba de ELISA, mientras que para la Haptoglobina es un método bioquímico, más rápido y que puede ser más fácilmente adaptado a los sistemas de análisis automáticos. La detección de Haptoglobina mediante ELISA también está disponible, por lo que pueden detectarse concentraciones más bajas que con el método bioquímico.

j) Ultrasonografía

La ecografía es un método útil para observar cambios en la glándula mamaria, ya que los ultrasonidos nos pueden aportar información sobre la estructura de la glándula de manera no invasiva, rápida e indolora (Fragkou *et al.*, 2014). La imagen ecográfica del parénquima mamario se realiza por contacto directo del transductor con la piel de la glándula. El parénquima se ve como una estructura homogénea y ecogénica, con algunas estructuras anecoicas en su interior, que se corresponden con grandes conductos de leche o vasos. El seno lactífero se visualiza como una estructura de anecoica a hipoeoica en la parte inferior. Esta técnica se utiliza para la identificación de estructuras como hematomas y abscesos en el parénquima mamario que, debido a su tamaño o ubicación, no pueden ser identificadas en el examen clínico (Lazaridis *et al.*, 2012) y otros cambios patológicos en las ubres (Fasulkov *et al.*, 2014). Hussein *et al.* (2015) encontraron en ovejas, que la exploración ecográfica de la ubre, especialmente de los ganglios linfáticos inguinales, puede ayudar mucho en la evaluación de la mastitis subclínica. Los ganglios linfáticos superficiales inguinales se pudieron identificar fácilmente y aparecían como una estructura ovalada con una cápsula ecogénica. Todos los ganglios tenían un parénquima anecoico o hipoeoico con una estructura ecogénica lineal en el centro. La longitud, la profundidad y el área ecográficas de los ganglios linfáticos inguinales superficiales aumentaron significativamente en los grupos con ubres infectadas. Se registró una correlación positiva entre el RCS y la longitud, profundidad y área de los ganglios. Sus umbrales críticos para la longitud, la profundidad y el área ecográfica del ganglio linfático inguinal superficial fueron de 11,5 mm, 7,8 mm y 13,5 mm², respectivamente y de 400×10^3 cel/mL.

k) Catalasa

La catalasa es una enzima presente en la leche, pero dado que parte de su origen es bacteriano y leucocitario se ha relacionado el aumento de la actividad de esta enzima en la leche con la aparición de mamitis (Kitchen *et al.*, 1981; Fox y Kelly, 2006)

La catalasa presente en la leche provoca la descomposición del peróxido de hidrógeno en agua y oxígeno, por lo que si la leche proviene de una glándula infectada observaremos la aparición de burbujas causadas por la liberación del oxígeno. Podemos medir la actividad de esta enzima después de añadir una cantidad conocida de peróxido de hidrógeno a una cantidad determinada de leche de dos maneras, bien midiendo la producción del oxígeno que se obtiene de la reacción o midiendo la cantidad restante de peróxido de hidrógeno en la muestra después de la degradación (Leth *et al.*, 2004; Fox y Kelly, 2006).

Hay varios artículos, sobre todo en ganado vacuno, que demuestran que en presencia de mamitis hay un aumento en la actividad de la catalasa (Kitchen *et al.*, 1976, 1981; Fütő *et al.*, 2012). Kitchen y Middleton (1976) obtuvieron que la actividad catalasa en leche que procedía de vacas sanas era de 0,1 U/mL, mientras que en leche de glándulas mamíticas podía llegar a valores de 4 U/mL. También se ha visto que existe una correlación positiva entre la catalasa y el RCS, debido a que la catalasa entra en la leche a través de las células somáticas, por lo que, si el RCS es un buen indicador de la presencia de mamitis, también lo es la catalasa (Hamed *et al.*, 2008; Farkye, 2011).

Kang *et al.* (2002) encontraron que si el recuento bacteriano en la leche era elevado existía una correlación elevada ($r = 0,89$) entre el recuento de estas bacterias y la actividad de la catalasa. Para la prueba introdujeron 100 μ L de leche en una pipeta Pasteur, y la misma cantidad de H₂O₂ al 3%, agitaron bien la mezcla y tras 5 min de reacción, midieron los mm de longitud de la columna de gas de O₂ liberado por reacción enzimática. Concluyeron que este método podía ser útil para la detección de leche con mamitis ya que resultaba muy sencillo y barato de realizar, aunque tenía como inconveniente, que el límite inferior que podía ser detectado era elevado ($\log \text{Ufc/mL} > 5,0$).

Aunque hay artículos que muestran que se identificó la catalasa a principios del siglo XX (Kastle y Roberts, 1909; Grimmer, 1926) y que podría ser un buen indicador para la detección de mamitis, no es un método muy usado en la actualidad (Fox y Kelly, 2006). Sin embargo, sí se usa más frecuentemente para comprobar la calidad higiénica de la

leche ya que esta enzima se inactiva después de una pasteurización a temperatura baja (Hirvi y Griffiths, 1998; Kang *et al.*, 2002).

A la hora de interpretar el resultado para la detección de mamitis hay que tener en cuenta que podemos encontrar esta enzima en la leche en condiciones fisiológicas (varía según el estado de lactación y la alimentación del animal) y que una recogida poco cuidadosa de las muestras puede propiciar la contaminación de las mismas por distintos gérmenes, ocasionando una interpretación equivocada del resultado obtenido.

Tal y como sugieren algunos artículos, la detección de mamitis mejoraría si se combinaran otros parámetros como la CE o la producción de leche junto con la catalasa (de Mol *et al.*, 1999; van Asseldonk *et al.*, 1999)

l) N-acetil- β -D-glucosaminidasa (NAGasa)

Los niveles de esta enzima pueden usarse como método indirecto de detección de mamitis ya que valora el daño celular producido como consecuencia de la respuesta inflamatoria de la glándula con mamitis.

En el ganado vacuno se ha visto una relación positiva directa entre la sintomatología clínica, la cantidad de ADN bacteriano y la NAGasa (Kalmus *et al.*, 2013).

Es un test sencillo, rápido y barato en el que la cantidad presente en la leche de esta enzima es medida fluorométricamente mediante la reacción producida entre el sustrato y la leche, estando asociada proporcionalmente la cantidad de fluorescencia obtenida con la cantidad de células somáticas de la leche y con la inflamación de la glándula mamaria (Kitchen *et al.*, 1984). Existe gran cantidad de bibliografía que correlaciona niveles elevados de la actividad de NAGasa con la presencia de mamitis, por lo que podría ser considerado un buen método de detección de la enfermedad.

Debido a que es el método de detección en el que se basa este estudio, se desarrolla más en profundidad en el siguiente capítulo.

m) Métodos basados en el uso de biosensores

Los biosensores son dispositivos en los que hay un elemento biológico, que es el responsable de la detección, al que se le une un transductor físico-químico. El sustrato que queremos detectar interacciona con el elemento biológico y produce una señal que es transformada en una señal electrónica por el transductor. Esta señal nos indica si está presente la sustancia que queremos detectar y en qué concentración se encuentra en función de su intensidad. Para obtener unos buenos valores de sensibilidad y

especificidad, el elemento biológico debe ser selectivo y específico de la sustancia que queremos detectar.

Una de las ventajas de los biosensores es que pueden ser colocados *on-line* en la máquina de ordeño, lo cual, junto con un sistema informático que procese la información, hace posible una detección rápida de la existencia de algún problema en la leche, incluso puede llegar a impedir que la leche con alguna alteración se mezcle con la leche normal.

Algunas de las características que deben tener unos buenos biosensores son: una alta sensibilidad y especificidad, que precisen un bajo mantenimiento, que sean baratos, rápidos y que sus componentes sean de fácil limpieza, reutilizables y de larga duración.

Muchos de estos sensores se han encaminado sobre todo a la detección de sangre, pero también pueden utilizarse para detectar coágulos y/o descamaciones en la leche. Por lo tanto, estos sistemas resultan útiles para el diagnóstico de mamitis en su forma clínica en las que, a diferencia de las subclínicas, sí se producen modificaciones macroscópicas en la leche. Los mejores resultados se han obtenido con sensores para la detección de sangre. Whyte *et al.* (2004) desarrollaron un sensor óptico que detectaba sangre con una sensibilidad del 100% y una especificidad del 99,6%. En el mismo año, Maassen-Francke *et al.* (2004) también obtuvieron muy buenos resultados, llegando a clasificar correctamente un 90% de las muestras, utilizando sensores ópticos para detectar coágulos y descamaciones en la leche.

Se han desarrollado biosensores basados en la detección de la actividad de la catalasa que han demostrado ser una herramienta muy útil, rápida y fiable para el diagnóstico de mamitis (Fűtő *et al.*, 2012). Leth *et al.* (2004), desarrollaron un prototipo para medir la actividad de la catalasa en la leche llamado SIRE biosensor que podía ser usado de manera automática en la sala de ordeño. Este biosensor se basaba en la medición de los productos que se generaban cuando la catalasa presente en la leche producía la degradación de una cantidad de peróxido de hidrógeno que era añadido a la muestra de leche. El dispositivo está formado por una sonda con unos electrodos que detectan la señal amperométrica que se produce antes y después de adicionar el peróxido de hidrógeno a la muestra, después estas señales son procesadas por un sistema informático. Cuando se añade peróxido de hidrógeno a una muestra que no tiene actividad catalasa, se provoca un aumento de la señal, sin embargo, si la muestra presenta actividad de la enzima provocará un descenso de la señal proporcional a su concentración en la muestra de leche.

Wu *et al.* (2005) desarrollaron un biosensor para la detección de ADN, lo cual implicaba la detección de manera indirecta de células somáticas en leche de vaca. Su funcionamiento se basaba en el uso de un fotodiodo que captaba la intensidad de fluorescencia que emitía una muestra tras ser sometida a una excitación a longitud de onda determinada, y producía una corriente eléctrica proporcional a la intensidad de fluorescencia captada.

Mottram *et al.* (2007), mediante el análisis de leche procedente de glándulas con mamitis y sanas, compararon el funcionamiento de un prototipo multisensor con un sensor de CE y electrodos selectivos para el sodio, cloro y potasio. El multisensor estaba compuesto de 15 sensores sensibles a cationes y aniones inorgánicos y orgánicos, de electrodos selectivos a sodio, cloro y potasio y de un electrodo de pH. Estos sensores comparaban las medidas tomadas con las de un electrodo de referencia. Se obtuvo que el prototipo multisensor conseguía una mayor sensibilidad (93%) y especificidad (96%) que el sensor de CE (56% de sensibilidad y 82% de especificidad) y los electrodos selectivos (70% de sensibilidad y 81% de especificidad). A pesar de los buenos resultados, concluyeron que eran necesarios más estudios para incluir otros factores de variación como la alimentación, el estado de lactación, el tipo de infección, la raza, etc. que puedan influir en los resultados.

Pemberton *et al.* (2001) estudiaron el desarrollo de un biosensor con electrodos de carbono para la detección de la enzima NAGasa. Sumergieron el electrodo en el sustrato 1-naftil N-acetil- β -D-glucosaminidina y aplicaron una corriente eléctrica, después añadieron una cantidad conocida de NAGasa obteniendo una respuesta amperimétrica proporcional a la concentración de la enzima. Welbeck *et al.* (2011), crearon otro biosensor en el que se obtuvo el valor de $1\mu\text{g/mL}$ como límite de detección, por lo que los autores concluyeron que se necesitaban más estudios ya que los niveles de esta enzima eran superiores a la capacidad de detección obtenida por el biosensor. Mottram *et al.* (2000) obtuvieron que era posible detectar concentraciones de NAGasa en una solución tamponada mediante un sensor de electrodo de carbono serigrafiado. Kumar *et al.* (2020) elaboraron un dispositivo óptico usando un interferómetro Fabry-Pérot de silicio poroso. Las muestras utilizadas tenían unos valores de RCS de menos de 100×10^3 cel/mL para la leche sana, entre $300\text{-}600 \times 10^3$ cel/mL para mamitis subclínica y de más de 1000×10^3 cel/mL para mamitis clínicas. Se observó que el biosensor funcionaba correctamente con distintos valores de RCS y diferentes patógenos, tanto para mamitis clínicas como

subclínicas. Se obtuvo un rango de niveles de NAGasa de entre 1,0 a 4,2 $\mu\text{M}/\text{min}$, presentando un límite de detección de 0,51 $\mu\text{M}/\text{min}$. Nirala y Shtenberg (2021), desarrollaron un biosensor, basado en espectroscopia Raman de superficie (SERS) para la detección de la actividad de la NAGasa, con el que se pudo diferenciar la leche sana, de la que presentaba mamitis subclínica y clínica. Samanta *et al.* (2024) crearon un biosensor de canal meta-nanoestructurado basado en transistores de efecto de campo (MNC-bioFET) para la detección de la NAGasa, capaz de detectar la enzima en microgotas (0,5 μL) de leche comercial al 3%, logrando un límite de detección de 30,3 aM.

5. DETERMINACIÓN DE NAGasa COMO MÉTODO DE DIAGNÓSTICO DE MAMITIS

5.1. INTRODUCCIÓN

La NAGasa es una enzima intracelular que se encuentra dentro de los lisosomas en las células epiteliales secretoras y en los leucocitos. Debido al daño en las membranas celulares y al cambio en la permeabilidad vascular que se produce como consecuencia de la reacción inflamatoria en la glándula durante la mamitis, la NAGasa (junto con otras enzimas relacionadas con el proceso inflamatorio como la beta-glucuronidasa, LDH, fosfatasa alcalina, etc.) es secretada a la leche, motivo por el cual, este tipo de enzimas aumentan notoriamente en la misma durante la enfermedad (Kitchen *et al.*, 1978, 1984; Fox *et al.*, 1988; Pyörälä, 2003).

El primer informe sobre la NAGasa en la leche parece ser el de Mellors en 1968, el cual ya sugirió que podría ser un buen indicador de mamitis, aunque la efectividad de esta enzima no fue comprobada hasta el 1976 por Kitchen (citado por Fox y Kelly, 2006). Kitchen *et al.* (1978) explicaron que el aumento de la NAGasa en la leche durante la enfermedad, es debido a que las alteraciones producidas en las membranas de las células como consecuencia de la mamitis provocan su paso desde el citoplasma hacia el espacio alveolar, motivo por el cual comenzó a considerarse como un buen indicador de la enfermedad. Desde entonces, gran cantidad de autores han demostrado su potencial para el diagnóstico de mamitis en distintas especies: En vacuno (Kitchen *et al.* 1978; Mattila *et al.*, 1986; Miller y Paape, 1988; Holdaway *et al.*, 1996; Pyörälä, 2003; Nielsen *et al.*, 2005; Bansal

et al., 2005; Chagunda *et al.*, 2006; Babaei *et al.*, 2007; Nyman *et al.*, 2014; Hovinen *et al.*, 2016); en caprino (Timms y Schultz, 1985, Maisi, 1990; Barth *et al.*, 2010; Kalmus *et al.*, 2013; Stuhr *et al.*, 2013; Persson *et al.*, 2014); en ovino (Maisi *et al.* 1987; Moroni y Cuccuru, 2001; Leitner *et al.*, 2001, 2003, 2004a) e incluso en camello (Seligsohn *et al.*, 2021).

5.2. DETERMINACIÓN

La determinación de la actividad de esta enzima se basa en métodos de fluorometría y de colorimetría (Kitchen *et al.*, 1978; Fox *et al.*, 1985; Mattila *et al.*, 1986; Larsen *et al.*, 2010). El método de detección de Kitchen y Middleton (1976), utiliza el N-acetil- β -D-glucosamina-p-nitrofenol como sustrato, que por hidrólisis se transforma en p-nitrofenol, produciendo un color amarillento a pH básico, gracias al cual se cuantifica la actividad de la enzima. El método fluorométrico de Kitchen *et al.* (1978), se basa en la capacidad que tiene la NAGasa de la leche de liberar la 4-metilumbeliferona (4-MU) del sustrato 4-metil-umbeliferil-N-acetil- β -d-glucosaminida (4-MUAG) en un medio ácido. El 4-MU emite fluorescencia en un ambiente alcalino, lo cual puede utilizarse para medir la actividad NAGasa de la leche. Este método es sencillo y barato, y permite analizar muestras congeladas (Mattila *et al.*, 1986). Otro método para la detección de la NAGasa es el desarrollado por Nogai *et al.* (1996), con el que la NAGasa transforma la 4-MUAG en 4-MU que tiene la propiedad de emitir fluorescencia, la cual es medida con un fluorímetro. La actividad se expresa como nanomoles metilumbeliferona liberada por minuto por mL de muestra.

Hovinen *et al.* (2016) utilizaron para su estudio un método fluorométrico modificado del de Kitchen *et al.* (1978) y Mattila *et al.* (1986). Las muestras control de leche con una concentración conocida de 4-MU provenían de una vaca con mastitis (control 1, con alta actividad NAGasa) y de una vaca clínicamente sana (control 2, con baja actividad NAGasa). La muestra de control 1 (alta actividad NAGasa) se usó para determinar la actividad de la enzima y la muestra control 2 (baja actividad NAGasa) para seguir la degradación del sustrato. Se mezclaron 10 microlitros de muestra con 40 μ l de sustrato (2,25 mM) 4-MUAG en tampón de citrato (0,25 M, pH 4,6). Esta mezcla se incubó 14 minutos a 20° C en los que la NAGasa en el ambiente ácido liberó el 4-MU del sustrato. La fluorescencia del 4-MU se midió con el Fluoroscán 374, usando una excitación de 355 nm filtro y un filtro de emisión de 460 nm. La actividad de NAGasa fue expresada en

pmoles de 4-MU/min/ μ l de leche a 20° C. El límite superior de cuantificación para actividad de la NAGasa fue de 24,49 pmol de 4-MU/min/ μ l de leche a 20° C y el inferior de 0,10 pmol de 4-MU/min/ μ l de leche a 20° C.

Este método tiene como inconveniente que son necesarios equipos de laboratorio para su detección, por lo que algunos autores han estudiado en el ganado vacuno la utilización de biosensores automatizados en línea para su determinación (ver apartado m del punto 4.2).

5.3. NIVELES FISIOLÓGICOS

Se ha intentado a lo largo del tiempo establecer un umbral para la diferenciación entre la leche sana y la leche de glándulas con mastitis, pero el establecimiento de un único umbral es complicado ya que la enzima también sufre variaciones debido a otros factores no infecciosos. En vacuno, Kitchen *et al.* (1984) detectaron variaciones estadísticamente relevantes en la actividad de la NAGasa según la glándula se considerara sana (bacteriología negativa y RCS < 500 × 10³ cel/mL), con mastitis inespecífica (bacteriología negativa y RCS > 500 × 10³ cel/mL), con infección latente (bacteriología positiva y RCS < 500 × 10³ cel/mL) o mastitis específica (bacteriología positiva y RCS > 500 × 10³ cel/mL). Se obtuvieron valores medios de 18,3; 55,8; 20,6 y 62,1 μ mol/L min, respectivamente, proponiendo el valor de 26 μ mol/L min como umbral para el diagnóstico de mastitis. Pyorala *et al.* (1997) propusieron para la detección de vacas infectadas un umbral de 40 nmol/mL min y una ratio de 5 entre las glándulas infectadas y las glándulas con menor contenido en NAGasa. Chagunda *et al.* (2006) observaron cómo variaba la sensibilidad y la especificidad de la NAGasa en función del valor umbral utilizado. La sensibilidad obtuvo valores entre el 35,4 y el 77,4%, mientras que la especificidad sólo varió entre el 94,1 y el 99,5%. Los umbrales para la sensibilidad y especificidad más alta fueron de 77,3 μ mol/L min y de 117,4 μ mol/L min. Hovinen *et al.* (2016), también en vacas, mostraron que con un valor umbral en la actividad de la NAGasa de 0,76 pmoles 4-MU/min/ μ l leche se diferenciaban las glándulas sanas de aquellas con mastitis subclínica con una sensibilidad del 85% y una especificidad del 84% con una precisión de 0,85. Si se establecía el punto de corte en 1,19 pmoles 4-MU/min/ μ l leche, se podía diferenciar las glándulas sanas de aquellas con mastitis clínica con una sensibilidad del 99% y una especificidad del 98% con una precisión de 0,99. El punto de corte de 5,3 pmoles 4-MU/min/ μ l leche diferenciaba las glándulas con mastitis subclínica de aquellas

con mamitis clínica con una sensibilidad del 86% y una especificidad del 90% con una precisión de 0,88. Basados en su estudio consideraron valores normales en la actividad de la NAGasa entre 0,1–1,04 pmoles 4-MU/min/μl leche en glándulas sanas de animales con más de 30 días de lactación. Este valor es bajo en comparación con los valores de leche normal encontrados en otros estudios, lo cual puede explicarse, por una parte, por el uso de una menor temperatura de incubación de las muestras (20°C) y, por otra parte, por el bajo RCS ($<100 \times 10^3$ cel/mL) utilizado por estos autores como criterio para leche normal, en comparación con otros estudios que usan límites de RCS más altos o sin crecimiento en cultivo bacteriológico como criterio para leche normal como los de Kitchen *et al.* (1978), Emanuelson *et al.* (1987), Miller y Paape (1988), Berning y Shook (1992) y Nielsen *et al.* (2005).

5.4. VARIACIÓN NAGASA SEGÚN ESTADO SANITARIO DE LA GLÁNDULA MAMARIA

Gran cantidad de estudios muestran el aumento de la actividad de la NAGasa en las glándulas con infección con respecto a las sanas en vacuno, caprino y ovino (tabla 4).

Tabla 4. Valores de NAGasa publicados en diferentes trabajos de investigación.

Autor	Especie	Estado sanitario glándula	Valor NAGasa
Nagahata <i>et al.</i> (1987)	Vacuno	Sana	9,5 nmol/mL min
		Mamitis clínica	500 nmol/mL min
Wilson <i>et al.</i> (1991)	Vacuno	Sana	1,05 μmol/L min
		Mamitis crónica	11,16 μmol/L min
Holdaway <i>et al.</i> (1996)	Vacuno	Sana (primeros chorros)	0,685 μmol/L
		Infectada (primeros chorros)	1,002 μmol/L
		Sana (apurado)	0,622 μmol/L
		Infectada (apurado)	1,190 μmol/L
Nielsen <i>et al.</i> (2004)	Vacuno	Sana	0,28 μmol/L
		Infectada	0,77 μmol/L
Bansal <i>et al.</i> (2005)	Vacuno	Sana	0,46 μmol/L min
		Mamitis inespecífica	0,76 μmol/L min
		Mamitis específica	0,80 μmol/L min
Chagunda <i>et al.</i> (2006)	Vacuno	Sana	39,05 μmol/L min
		Mamitis clínica	69,42 μmol/L min
Åkerstedt <i>et al.</i> (2011)	Vacuno	Sana	0,8–6,1 U/L
		Mamitis subclínica	25,0 U/L
Hovinen <i>et al.</i> (2016)	Vacuno	Sana	0,62 pmol 4-MU/min/μl
		Mamitis subclínica	2,42 pmol 4-MU/min/μl

Nyman <i>et al.</i> (2014)	Vacuno	Mamitis clínica	16,65 pmol 4-MU/min/ μ l
		Sana	4,69 U/L
Leitner <i>et al.</i> (2004b)	Caprino	Infectada	5,76 U/L
		Sana	15,6 μ mol/L min
Leitner <i>et al.</i> (2004d)	Caprino	Mamitis subclínica (S.aureus/ECN)	59,2 μ mol/L min
		Sana	13,6 μ mol/L min
Barth <i>et al.</i> (2010)	Caprino	Mamitis subclínica (ECN)	37,9 μ mol/L min
		Sana	0,405 nmol/min/mL
Moroni y Cuccuru (2001)	Ovino	Infectada	0,721 nmol/min/mL
		Sana (inicio lactación)	15,62 U/ μ l min
		Infectada (inicio lactación)	24,75 U/ μ l min
		Sana (final lactación)	20,28 U/ μ l min
Leitner <i>et al.</i> (2003)	Ovino	Infectada (final lactación)	45,30 U/ μ l min
		Sana	1,145 μ mol/L min
Leitner <i>et al.</i> (2004a)	Ovino	Infectada	3,655 μ mol/L min
		Sana	22,3 U
		Infectada	95,5 U

Nagahata *et al.* (1987) en vacas con mamitis clínica observaron un incremento brusco de NAGasa con un valor máximo alcanzado el tercer día postinfección. Posteriormente, los valores disminuyeron de manera paulatina hasta niveles basales el séptimo día tras la infección. En este trabajo se obtuvieron valores de 9,5 nmol/mL min para la NAGasa en las glándulas sanas, estos niveles aumentaron hasta valores de 500 nmol/ml min en las glándulas con mamitis aguda, que fueron las que obtuvieron niveles más altos. Wilson *et al.* (1991) registraron mayores valores de NAGasa en las glándulas con mamitis crónica (11,16 μ mol/L min) que en las sanas (1,05 μ mol/L min).

Otros autores han encontrado variaciones estadísticamente relevantes en el ganado vacuno entre glándulas libres de infección e infectadas al estudiar el log NAGasa, Holdaway *et al.* (1996) obtuvieron valores de 0,685 y 0,622 μ mol/L en las sanas y de 1,002 y 1,190 μ mol/L para las infectadas (para leche de primeros chorros y apurado respectivamente). Los valores de Nielsen *et al.* (2004) para las sanas fueron de 0,28 μ mol/L para las sanas y 0,77 μ mol/L para las infectadas. El estudio de Bansal *et al.* (2005) obtuvo en la leche de apurado valores de NAGasa de 0,80 μ mol/L min para las mamitis específicas, de 0,76 μ mol/L min para las inespecíficas y 0,46 μ mol/L min para las glándulas sanas.

También en vacas, Chagunda *et al.* (2006) registraron valores medios en la leche obtenida de las glándulas sanas de 39,05 μ mol/L min y de 69,42 μ mol/L min en la que

provenía de glándulas con mastitis clínica y Åkerstedt *et al.* (2011) obtuvieron niveles de NAGasa para glándulas sanas entre 0,8 y 6,1 U/L, mientras que el valor medio para las glándulas con infección subclínica fue de 25,0 U/L.

Larsen *et al.* (2010) observaron que 7h después de una infusión de endotoxina de *E. coli* en la glándula mamaria, ya se produjo un aumento en los valores de NAGasa que se mantuvo durante los 5 días siguientes a la administración de la endotoxina.

Suojala *et al.* (2010) y Kalmus *et al.* (2013) concluyeron que la actividad del enzima estaba relacionada con la severidad de los signos clínicos, y cuanto más graves mayores eran los niveles de NAGasa. Estos resultados coinciden con otros estudios realizados como el de Pyörälä *et al.* (2011), en el que observaron que los mayores valores de esta enzima se daban en las glándulas con infección clínica, seguidos de los que presentan las glándulas con una infección subclínica, obteniendo niveles muy bajos en la leche secretada por glándulas libres de infección. Hovinen *et al.* (2016) observaron también que la leche de cuartos con mastitis clínica tuvo de media una actividad de NAGasa mucho mayor que la leche de cuartos con mastitis subclínica y que la de las glándulas sanas (16,65; 2,42 y 0,62 pmol of 4-MU/min/μl respectivamente). Concluyeron que, con un punto de corte bajo, la actividad NAGasa podía diferenciar con mucha exactitud las glándulas sanas de las que tenían mastitis, e incluso diferenciar entre mastitis subclínicas y clínicas, lo que podría explicarse por la mayor destrucción del epitelio de la ubre en vacas con signos clínicos. Todos estos estudios corroboran las mismas conclusiones obtenidas ya anteriormente por otros autores (Bansal *et al.*, 2005; Nielsen *et al.*, 2005; Chagunda *et al.*, 2006; Larsen *et al.*, 2010).

Siguiendo con el ganado vacuno, Nyman *et al.* (2014) encontraron que el estado de infección intramamaria se asoció significativamente con todos los indicadores de salud estudiados (RCS, LDH, y NAGasa) excepto para la fosfatasa alcalina, obteniendo valores de la actividad de la NAGasa en las glándulas con mastitis de 5,76 U/L y de las glándulas sanas de 4,69 U/L. Todos los indicadores de salud estudiados se vieron afectados además de por la infección por otros factores, que en el caso de la NAGasa fueron el número de parto, la producción de leche, el estado de lactación, concentración de urea en leche y el momento de la toma de muestras.

En cabras, Leitner *et al.* (2004b y 2004d) detectaron también valores más altos de NAGasa en la leche de las glándulas con mastitis subclínica. Se obtuvieron valores distintos en los dos estudios en función del agente que causó la infección. En el primero

fue causada por *S. aureus*. y ECN, y los valores registrados fueron de 15,6 $\mu\text{mol/L min}$ en glándulas sanas y de 59,2 $\mu\text{mol/L min}$ en las infectadas. En el segundo, en el que la infección fue provocada sólo por ECN, los resultados fueron de 13,6 $\mu\text{mol/L min}$, para las glándulas sanas y de 37,9 $\mu\text{mol/L min}$, para las infectadas. Barth *et al.* (2010) detectaron que la infección de las glándulas en cabras lactantes medias y tardías ejerció una influencia notable sobre el RCS, la lactoferrina y la actividad de la NAGasa (0,405 nmol/min/mL para las glándulas sanas vs 0,721 nmol/min/mL para las infectadas). Este efecto sobre la actividad de la NAGasa también ha sido confirmado para cabras en la lactación temprana (Stuhr *et al.*, 2013).

En ovino, Moroni y Cuccuru (2001) detectaron diferencias entre la actividad de la NAGasa en glándulas sanas e infectadas con ECN. Obtuvieron valores de 15,62 U/ $\mu\text{l min}$ para las sanas y de 24,75 U/ $\mu\text{l min}$ para las infectadas al inicio de la lactación y de 20,28 de U/ $\mu\text{l min}$ en las sanas y de 45,30 U/ $\mu\text{l min}$ en las infectadas al final de la misma. Posteriormente, Leitner *et al.* (2003) encontraron el mismo efecto a causa de la infección, con valores de 22,9 U (1,145 $\mu\text{mol/L min}$) en glándulas sanas y 73,1 U (3,655 $\mu\text{mol/L min}$) en glándulas infectadas. Datos éstos muy parecidos a los obtenidos posteriormente por Leitner *et al.* (2004a) donde registraron valores de 22,3 U en las sanas y de 95,5 U en las infectadas.

Aunque la mayoría de los artículos publicados han observado una correlación positiva entre el aumento de la actividad de esta enzima y la infección, hay algunas publicaciones en las que no se encontró dicha relación. Piccinini *et al.* (2007) en vacuno, obtuvieron valores más altos de NAGasa (39,81 U) en leche con valores de RCS entre 100×10^3 y 200×10^3 cel/mL que en leche con valores de RCS superiores a 200×10^3 cel/mL (33,88 U). En un estudio realizado en dromedario tampoco se encontró efecto significativo, aunque en este caso fue atribuido al uso de un kit específico para vacas que probablemente no era el correcto para la especie usada en el estudio (Guliye *et al.*, 2002).

5.5. OTROS FACTORES DE VARIACIÓN

Hay que tener en cuenta que el uso de la NAGasa para la detección de mamitis puede verse afectado por otros factores distintos a la enfermedad como pueden ser el estado de lactación, el número de parto, la edad del animal, el estado fisiológico, el nivel productivo y el momento de ordeño, como se ha visto en gran cantidad de artículos, sobre todo en el ganado vacuno (tabla 5). Aunque para algunos autores, ninguno de estos factores produce

un aumento tan elevado de la NAGasa como lo produce la presencia de infección intramamaria (Nyman *et al.*, 2016).

Tabla 5. Factores que afectan la actividad de la NAGasa en la leche según distintos trabajos de investigación.

Factor	Especie	Efecto observado	Autor
Estado de lactación	Vacuno	Alta postparto, disminuye al avanzar lactación, aumenta de nuevo al final	Piccinini <i>et al.</i> (2007) Hovinen <i>et al.</i> (2016), Nyman <i>et al.</i> (2014), Chagunda <i>et al.</i> (2006)
	Caprino	Estado lactación no afecta NAGasa Alta en 1ª semana y final de lactación. No se obtuvo diferencias significativas	Kalmus <i>et al.</i> (2013) Maisi (1990) Leitner <i>et al.</i> (2004d)
	Ovino	Alta al principio, disminución hasta el final Más alta al final de la lactación Mayor al final de lactación No se obtuvo diferencias significativas	Barth <i>et al.</i> (2010), Stuhr et al. (2013) Persson <i>et al.</i> (2014) Moroni y Cuccuru (2001), Leitner <i>et al.</i> (2001, 2003)
	Vacuno	Generalmente mayor en multíparas	Chagunda <i>et al.</i> (2006), Nyman <i>et al.</i> (2014), Hovinen <i>et al.</i> (2016), Kalmus <i>et al.</i> (2013)
	Caprino	Nº lactación no afecta NAGasa en animales sanos actividad mas alta en primíparas Generalmente mayor en multíparas No se obtuvo diferencias significativas	Piccinini <i>et al.</i> (2007) Maisi (1990) Stuhr <i>et al.</i> (2013), Leitner et al. (2001, 2003)
	Ovino	Baja variación entre ordeños Sin efecto significativo	Åkerstedt <i>et al.</i> (2011) Leitner <i>et al.</i> (2003)
Fracción de leche	Vacuno	Mayor actividad al final del ordeño Mayor actividad en primeros chorros	Hovinen <i>et al.</i> (2016), Bansal <i>et al.</i> (2005), Nielsen <i>et al.</i> (2005)
	Vacuno	Mayor actividad con patógenos mayores Mayor con patógenos mayores Mayor con <i>Streptococcus</i> que con ECN	Pyörälä et al. (2011), Kalmus et al. (2013) Stuhr et al. (2013) Leitner et al. (2001)
Tipo de patógeno	Caprino	Influencia significativa entre rebaños	Leitner et al. (2004d)
	Ovino	Influencia significativa entre rebaños	Leitner et al. (2003)
Efecto rebaño	Vacuno	Mayor en invierno o sin efecto Menor de septiembre a noviembre Estación no afecta actividad NAGasa	Chagunda et al. (2006) Nyman et al. (2014) Hovinen et al. (2016)

a) Estado de lactación

Aunque existen diferencias en los distintos artículos publicados sobre el efecto del estado de la lactación en la actividad de la NAGasa, en general, la mayoría concluyen con resultados similares, en los que se observan niveles más altos después del parto que

disminuyen conforme avanza la lactación, observándose en algunos casos, un nuevo aumento en la actividad de la enzima al final de la misma.

En ganado vacuno, hay varios estudios que muestran que la actividad de la NAGasa se ve afectada por el estado de lactación tanto en las glándulas sanas como en las que presentan mamitis. Berning y Shook (1992), Holdaway *et al.* (1996) y Piccinini *et al.* (2007) detectaron que, al avanzar la lactación, los niveles de la NAGasa disminuían, pero volvían a aumentar al final de la lactación. Hovinen *et al.* (2016) obtuvieron que la actividad de la NAGasa es más elevada durante los primeros 30 días de lactación (1,04 pmol of 4-MU/min/ μ l milk at 20 °C) y después disminuye paulatinamente hasta los 100 días postparto (0,56 pmol of 4-MU/min/ μ l milk at 20 °C), a partir de los cuales, no se aprecian grandes cambios en las glándulas sanas (0,61 pmol of 4-MU/min/ μ l milk at 20 °C). Sin embargo, tiende a aumentar al final de la lactación en las glándulas con mamitis. Esto corrobora otros estudios en los que se vio que la actividad de esta enzima era mayor hasta el día 40 de lactación y no se registraron cambios en las actividades de NAGasa de la leche después de los primeros 100 días en las glándulas sanas (Berning y Shook, 1992; Chagunda *et al.*, 2006; Piccinini *et al.*, 2007). Nyman *et al.* (2014) comprobaron que tanto en el grupo de animales negativos a la infección como en el grupo en el que se incluían los animales negativos y positivos, la actividad de la NAGasa era más elevada al principio de la lactación. En el grupo de los animales sanos la NAGasa disminuía hasta el día 40 en el que se estabilizaba y volvía a aumentar aproximadamente sobre el día 160, mientras que en el grupo en el que se incluían todos los animales, los valores de NAGasa descendían a medida que avanzaban los días de la lactación, pero no volvían a aumentar. Miller y Paape (1988) sugirieron la determinación de diferentes valores de referencia para la lactación temprana, intermedia y tardía. Persson *et al.* (2014) encontraron en animales sanos, que el estado de lactación afectaba significativamente a la NAGasa, este valor aumentaba al final de la lactación en comparación con la lactación temprana y media. Por el contrario, Kalmus *et al.* (2013) obtuvieron que los niveles de NAGasa no se veían afectados por el estado de lactación.

En ganado caprino, Maisi (1990) observó niveles más altos en la primera semana después del parto y al final de la lactación (10-11 meses), mientras que los valores más bajos se registraron entre el segundo y el cuarto mes de lactación. Leitner *et al.* (2004d) en caprino no obtuvieron un efecto significativo. Barth *et al.* (2010) encontraron que tanto el RCS como la NAGasa seguían el mismo patrón durante el periodo de muestreo, sufrían

un fuerte aumento desde la primera semana de toma de muestras hasta la segunda y descendían bruscamente en la tercera semana independientemente del estado de infección de las glándulas. En caprino, Stuhr *et al.* (2013), observaron que los valores de NAGasa estaban elevados en la primera semana de lactación y sufrían una disminución hasta el final del muestreo (6 semanas), concluyendo que el estado de lactación fue el factor que más influencia tuvo en las variaciones de la NAGasa. Persson *et al.* (2014) observaron en animales sanos que el estado de lactación afectaba significativamente al valor de la NAGasa, aumentando al final de la lactación (día 223 de media) en comparación con la lactación media (día 117 de media) y temprana (día 40 de media) obteniendo valores de 4,5 U/l; 1,3 U/l y de 1,9 U/l, respectivamente.

En ganado ovino, Moroni y Cuccuru (2001) detectaron que, tanto para la leche que procedía de glándulas sanas como la de glándulas infectadas, la actividad del enzima era mayor al final de lactación que al principio (20,28 vs 15,62 nmol/mL min para las sanas y 45,30 vs 24,75 nmol/mL min para las infectadas). Sin embargo, Leitner *et al.* (2001 y 2003) no obtuvieron diferencias significativas según el estado de lactación en la actividad de la NAGasa en las glándulas sanas en el primer estudio y para ninguno de los 3 estados sanitarios estudiados (glándulas sanas, infectadas con ECN e infectadas con estreptococos) en el segundo.

b) Número lactación

Se ha comprobado en diversos estudios, la influencia entre el número de lactación y la actividad de la NAGasa, pero los resultados varían en función de los autores.

En vacas, Holdaway *et al.* (1996) detectaron que los niveles de NAGasa aumentaban con la edad de la vaca, aunque las diferencias sólo fueron significativas en dos de los tres rebaños estudiados. Chagunda *et al.* (2006) obtuvieron que, en las vacas con mamitis clínica, la mayor actividad de NAGasa se observaba en el tercer parto (82,2 μ mol/L min vs 59,6 μ mol/L min en el primer parto). De forma similar, otros autores han descrito que la actividad de la enzima era menor en hembras primíparas que en múltiparas tanto en las glándulas sanas como en las que presentaban mamitis subclínica o mamitis clínica (Mattila *et al.*, 1986; Nyman *et al.*, 2014; Hovinen *et al.*, 2016). Sin embargo, Piccinini *et al.* (2007) en animales sanos, obtuvieron valores más altos de NAGasa en vacas primíparas (33,88 U; 1,698 μ mol/L min) que en múltiparas (25,70 U; 1,285 μ mol/L min). Kalmus *et al.* (2013) observaron que los niveles de NAGasa no se veían afectados por el número de parto.

En cabras los resultados también son contradictorios, mientras Maisi (1990) registró los valores más bajos en las cabras primíparas, Leitner *et al.* (2001, 2003, 2004d) no observaron diferencias significativas, al igual que Stuhr *et al.* (2013), para los cuales, el número de lactación no fue significativo en el log NAGasa, aunque sí observaron que los animales en su primer y segundo parto tenían la menor incidencia de mamitis.

c) Ordeño

Hay estudios en vacuno, en los que se observa que, la variación de la NAGasa en las glándulas sanas entre ordeños es baja (Åkerstedt *et al.*, 2011).

En ovejas, Leitner *et al.* (2003) detectaron que el RCS y la actividad de la NAGasa no se veían influidos por la hora del ordeño.

d) Fracción de leche

También hay estudios que ponen en evidencia la variación que puede sufrir la actividad de la NAGasa según en la fracción del ordeño en el que se realice la medida, aunque los resultados son contradictorios según los distintos autores.

En vacas, Bansal *et al.* (2005) y Hovinen *et al.* (2016) observaron que la actividad de NAGasa era más alta al final del ordeño que en la fracción inicial en las glándulas sanas. Sin embargo, Nielsen *et al.* (2005) registraron los mayores niveles en la leche de los primeros chorros tanto en glándulas sanas (0,36 vs 0,25 $\mu\text{mol/L min}$) como en infectadas (0,88 vs 0,72 $\mu\text{mol/L}$). En el mismo estudio concluyeron que es preferible usar muestras de cada glándula, ya que se encontraron que la actividad de NAGasa en la leche de la ubre completa que tiene una o más glándulas inflamadas, es casi tan baja como en la leche de vacas totalmente sanas debido a un efecto de dilución de las glándulas sanas.

Holdaway *et al.* (1996) detectaron que las diferencias más grandes en la actividad de la NAGasa entre glándulas sanas e infectadas se daban en el apurado (obteniéndose una diferencia del 22% en los primeros chorros y una del 62% en apurado). Bansal *et al.* (2005) corroboraron este estudio, describiendo que la mayor diferencia se encontraba en la leche de apurado (73,4%) con respecto a la leche de la primera fracción (70,22%) y a la leche máquina (68,09%). Se obtuvieron valores más elevados para el log NAGasa en la leche del final del ordeño que en los primeros chorros de leche tanto en las glándulas sanas (0,46 vs. 0,34 nmol/ml min) como en las infectadas (0,80 vs. 0,59 nmol/ml min), aunque la diferencia entre los valores fue más acusada en las glándulas con mamitis. También, Nielsen *et al.* (2005) concluyeron que la diferencia entre las glándulas

infectadas y sanas era mayor al final del ordeño y, además, que para determinar mejor la actividad del enzima era preferible utilizar muestras de leche procedentes de cada una de las glándulas en lugar de usar la leche de la mezcla de las glándulas de la misma ubre.

e) **Tipo patógeno**

Debido a que la NAGasa es un método que se basa en la detección indirecta de la reacción inflamatoria de la glándula, distintos autores han demostrado que una infección provocada por patógenos mayores provoca niveles más altos de esta enzima que una provocada por patógenos menores (Mattila *et al.*, 1986; Kalmus *et al.*, 2013), por lo que podría utilizarse para diferenciar si los patógenos que provocan la mastitis son mayores o menores (Miller y Paape, 1988; Berning y Shook, 1992; Pyörälä *et al.*, 2011).

En vacuno, Kitchen *et al.* (1984) encontraron diferencias significativas según si la mastitis era producida por patógenos mayores (48 $\mu\text{mol/L min}$) o menores (28 $\mu\text{mol/L min}$). Berning y Shook (1992) y Holdaway *et al.* (1996) registraron también diferencias significativas en el logaritmo de NAGasa, obteniendo valores de 1,65 nmol/mL en el caso de patógenos menores y de 2,15 nmol/mL min en el de los mayores. Pyorala *et al.* (1997) obtuvieron valores mayores de la enzima en las glándulas infectadas con coliformes, que en las que fueron infectadas con *S. aureus*, estreptococos o ECN (160,3; 71,0; 59,7 y 18,5 nmol/mL min, respectivamente). Kalmus *et al.* (2013) obtuvieron elevados valores de la actividad de la NAGasa en las muestras con grandes cantidades de ADN bacteriano procedente de *Trueperella pyogenes*, *Streptococcus uberis*, *E. coli* o *S. aureus* (24,5-22,5 pmoles 4-MU/min/ μl), mientras que en las muestras con *Corinebacterium bovis* y ECN se obtuvieron valores mucho menores (9,9 y 11,86 pmoles 4-MU/min/ μl respectivamente). Los niveles más altos de la enzima se obtuvieron de muestras con elevadas cantidades de *E. coli*, aunque valores bajos de esta bacteria también provocan incremento de la actividad de la NAGasa, esto puede ser debido a la reacción inflamatoria que produce su endotoxina. Hovinen *et al.* (2016) encontraron que las glándulas infectadas con patógenos menores como ECN o corinebacterias, tenían una actividad media de NAGasa de 3,19 pmol/min/ μl a 20 °C, mientras que las que estaban infectadas con patógenos mayores como *S. aureus*, algunos estreptococos o *E. coli* tenían unos niveles medios de la enzima de 15,96 pmol/min/ μl a 20 °C. Estableciendo un valor de corte de 2,63 pmoles 4-MU/min/ μl leche a 20 °C, se obtuvo una sensibilidad del 91% y una especificidad del 85% con una precisión de 0,88 para diferenciar mastitis producidas por patógenos mayores de las originadas por patógenos menores.

En caprino, Ryan *et al.* (1993) observaron que los niveles de NAGasa en animales sin infección intramamaria producida por bacterias y seronegativos al virus AEC eran menores (log NAGasa: de 0,03 - 0,36) que en los animales seropositivos a este virus (0,33 - 0,58). Por ello, llegaron a la conclusión de que el virus también provocaba un aumento en los valores de NAGasa, factor que podría provocar un descenso en la especificidad del método utilizado para la detección de mamitis. En cabras, Stuhr *et al.* (2013) también detectaron que las glándulas infectadas con patógenos mayores presentaban unos niveles superiores de NAGasa cuando eran comparadas con las no infectadas, pero no se encontraron diferencias significativas entre las glándulas infectadas con ECN o corinebacterias y las glándulas sanas. Sin embargo, Leitner *et al.* (2004a), en ovino sí encontraron diferencias significativas entre las glándulas infectadas con ECN y glándulas sanas.

En ovejas, Leitner *et al.* (2001) describieron diferencias significativas según si la infección estaba provocada por estreptococos (97,9 U; 4,89 $\mu\text{mol/L min}$) o por ECN (67,4 U; 3,37 $\mu\text{mol/L min}$), pero no detectaron variaciones significativas entre las diferentes especies de ECN. En el mismo estudio observaron que casi no hubo cambios en el estado bacteriológico de las mitades de las glándulas en el transcurso del período de lactación; El 90,6% de las glándulas no cambió su estado infectivo en 1-3 semanas después de la primera toma de muestras. Esto indica que una sola prueba de la leche, después de las primeras 2 semanas después del parto, podría servir para determinar el estado bacteriológico subclínico de las ovejas de manera individual y su prevalencia en el rebaño.

f) Efecto rebaño

Leitner *et al.* (2003), detectaron en el ganado ovino que el rebaño influía de manera significativa en el RCS medido con el Coulter® Counter y la actividad de la NAGasa. En el ganado caprino, Leitner *et al.* (2004d) también obtuvieron los mismos resultados para las dos variables.

g) Estación

En el ganado vacuno, Chagunda *et al.* (2006) observaron valores más altos de actividad de NAGasa en la leche durante los meses de invierno tanto en las glándulas sanas como en las que tenían mamitis clínicas. Nyman *et al.* (2014) obtuvieron que los valores de esta enzima eran menores en los meses de septiembre a noviembre en

comparación con el resto del año. Sin embargo, Hovinen *et al.* (2016) no encontraron que la estación afectara a la actividad de la NAGasa en las glándulas sanas.

El incremento de la actividad de la NAGasa debido a la infección suele ser mayor que la debida a otros factores de variación, por lo que, si se observan grandes variaciones en los niveles entre una muestra de leche y la siguiente, probablemente se deberá a una infección y no a una variación provocada por otros factores como el estado de lactación o el número de parto (Nyman *et al.*, 2016). En cualquier caso, es necesario tener en consideración el efecto de estos factores para evitar clasificar como enfermos a animales sanos (Chagunda *et al.*, 2006).

5.6. RELACIÓN ENTRE LA NAGasa Y OTROS MÉTODOS DETECCIÓN DE MAMITIS

a) Recuento de células somáticas (RCS)

Se ha demostrado una alta correlación entre la actividad de la NAGasa y el RCS en la leche (Kitchen *et al.*, 1978; Mattila *et al.*, 1986; Miller y Paape, 1988; Berning y Shook, 1992), habiendo obtenido una correlación positiva y significativa entre la actividad de la NAGasa y el RCS en la mayoría de los estudios.

En vacas, Bansal *et al.* (2005) obtuvieron una correlación entre $r = 0,45-0,50$ en mamitis subclínicas según la fracción de leche en la que se midió. Bansal *et al.* (2005) obtuvieron para mamitis clínicas una correlación de $r = 0,59$ clínicas, mientras que Hovinen *et al.* (2016) observaron una correlación de $r = 0,73$ para mamitis subclínicas. En pequeños rumiantes para mamitis subclínicas, Leitner *et al.* (2001) obtuvieron una correlación de $r = 0,85$ en oveja, mientras que en cabra, Leitner *et al.* (2004d) observaron una correlación de $r < 0,7$. En camello, Seligsohn *et al.* (2021) detectaron una correlación de $r = 0,54$.

En ganado vacuno, Kitchen *et al.* (1978) a pesar de que obtuvieron coeficientes de correlación elevados ($r = 0,86$), concluyeron que la NAGasa no podía utilizarse como método de detección del RCS, aunque sí podría usarse para valorar la integridad del tejido de la ubre. Nagahata *et al.* (1987) detectaron que, en leche de animales con mamitis clínica, la actividad de la NAGasa se elevaba conforme lo hacía el RCS. Shuster *et al.* (1991) encontraron que, en glándulas inoculadas con endotoxina, se producía un aumento en la NAGasa y el RCS muy parecido, que era seguido de un descenso también muy similar. Berning y Shook (1992) registraron un coeficiente de correlación alto ($r = 0,70$)

calculado con el logaritmo natural de la NAGasa y el RCS. Sin embargo, Bansal *et al.* (2005) obtuvieron coeficientes de correlación más bajos, variando los valores según si se medía en leche del inicio del ordeño ($r = 0,44$) o en el apurado ($r = 0,50$) en glándulas con mamitis subclínica. Hovinen *et al.* (2016) observaron que había una alta correlación entre NAGasa y RCS en glándulas con mamitis subclínica ($r = 0,73$), pero no encontraron correlación simple entre ellos en glándulas sanas, lo cual sugiere que una parte importante de la actividad de NAGasa proviene de las células epiteliales dañadas de la ubre. Sin embargo, otros investigadores como Chagunda *et al.* (2006) o Nyman *et al.* (2014) sí encontraron correlaciones de $r = 0,41$ y $r = 0,39$, respectivamente, entre los dos parámetros en glándulas sanas, aunque la correlación fue mayor en las glándulas con mamitis ($r = 0,59$ en el primer estudio y $r = 0,45$ en el segundo). Piccinini *et al.* (2007) en vacuno detectaron en animales sanos que los niveles de NAGasa y RCS no presentaban una correlación directa, lo que podría indicar que en estos animales la NAGasa no proviene principalmente de las células somáticas. En este artículo se obtuvieron valores más altos de NAGasa (39,81 U) en leche con valores de RCS entre 10×10^3 y 200×10^3 cel/mL, que en leche con valores de RCS superiores a 200×10^3 cel/mL (33,88 U).

Timms y Schultz (1985) en ganado caprino demostraron que el RCS tenía mayores variaciones diarias que la NAGasa. La correlación entre el RCS y NAGasa obtenida ($r = 0,54$) fue menor que la que han obtenido otros autores. Leitner *et al.* (2004d) obtuvieron una correlación entre las dos variables de $r < 0,7$. Barth *et al.* (2010) observaron una elevada correlación ($r = 0,76$) entre el log NAGasa y el log RCS, estos dos valores cambiaron durante el periodo de la toma de muestras, pero no de manera uniforme, lo que revela un efecto significativo del día de muestreo en las variables.

En ovejas, Leitner *et al.* (2001) obtuvieron una correlación de $r = 0,85$ entre la NAGasa y el RCS.

b) Conductividad eléctrica (CE)

No hay muchos estudios que relacionen la NAGasa con la CE. En vacuno, Jensen y Knudsen (1991) encontraron entre la CE y la NAGasa una correlación elevada ($r = 0,68$). Tinsky *et al.* (1995) obtuvieron que todas las muestras que presentaban una CE alta, también dieron valores elevados en el test para la NAGasa. Bansal *et al.* (2005) detectaron que, en función de la fracción de leche estudiada, el coeficiente de correlación entre la CE y la NAGasa variaba entre 0,35 y 0,56, obteniendo el mayor resultado para la leche

del final del ordeño. Emanuelson *et al.* (1987) registraron una correlación entre las dos variables de 0,52 cuando la infección era causada por patógenos mayores.

c) Lactato deshidrogenasa (LDH)

En vacuno, Chagunda *et al.* (2006) detectaron que la correlación entre la LDH y la NAGasa era menor en la leche de los animales sanos que en la procedente de mamitis clínicas ($r = 0,43$ vs $r = 0,56$). También se observaron los mismos resultados entre la LDH y el RCS ($r = 0,48$ vs $r = 0,76$), por lo que se concluyó que, debido a esa correlación positiva entre los tres valores, tanto la NAGasa como la LDH podrían ser buenos sustitutos del RCS en el diagnóstico de las mamitis. Nyman *et al.* (2014) también encontraron correlación entre la LDH y la NAGasa, siendo ésta mayor en el grupo en el que se incluyeron, tanto animales con mamitis como animales sanos, con respecto al grupo de sólo animales sanos ($r = 0,39$ vs $r = 0,46$).

d) Lactoferrina (Lf)

Barth *et al.* (2010) detectaron una elevada correlación entre el log de la actividad de la NAGasa y el log de la lactoferrina ($r = 0,81$). Estos valores cambiaron durante el periodo de la toma de muestras, pero no de manera uniforme, lo que revela un efecto significativo del día de muestreo en las variables. Las glándulas infectadas con su colateral sana presentaron diferencias significativas con las glándulas sanas con su colateral sana y con las sanas con su colateral infectada para el log RCS y log Lf, mientras que las diferencias entre las sanas con su colateral sana y las sanas con su colateral infectada no fueron significativas, lo cual podría indicar que las glándulas infectadas no influyeron en su colateral no infectada. Los resultados de este estudio indican que podría utilizarse la actividad de la NAGasa o la lactoferrina como métodos de detección de mamitis.

II. OBJETIVOS

Las mamitis son un grave problema para las granjas ovinas productoras de leche debido al perjuicio económico que provocan, sumado a que suponen un riesgo sanitario para el consumidor y un problema a nivel de bienestar animal. Por eso, es necesario el estudio y puesta a punto de nuevos métodos indirectos de detección de mamitis a nivel de granja.

Dado que en ovino son escasos los estudios concluyentes sobre el uso de la NAGasa como métodos de detección de mamitis, el objetivo general de esta Tesis Doctoral es el estudio del uso de la NAGasa en leche como método de detección de mamitis en ganado ovino Manchego. Para ello, se han realizado dos ensayos para conseguir los siguientes objetivos específicos:

1. Estudiar el efecto de la infección y otros factores no infecciosos (nivel productivo, estado de lactación, número de lactación y ordeño) sobre los valores de la NAGasa y su relación con la producción y otros estimadores indirectos de mamitis, como el recuento de células somáticas.
2. Estudiar el efecto del establecimiento de la infección intramamaria sobre la actividad de la NAGasa en la leche y observar la evolución de sus valores en las semanas posteriores a la infección.
3. Analizar la capacidad predictiva de la enzima para la detección de mamitis mediante el uso de distintos algoritmos.

III. MATERIALES Y MÉTODOS GENERALES

1. AUTORIZACIÓN ÉTICA

Los procedimientos se llevaron a cabo de acuerdo con las leyes españolas y europeas de protección animal. Este proyecto fue aprobado por el Comité de Ética de la Investigación de la Universidad Miguel Hernández con el código de aprobación ética DTA-JDS-001-09, de acuerdo con el Real Decreto español RD 53/2013 y la Directiva de la UE 2010/63/UE relativa a la protección de los animales utilizados para la investigación experimental y otros fines científicos.

2. MANEJO DE ANIMALES

Los dos estudios se llevaron a cabo en la Universidad Miguel Hernández (UMH), en las instalaciones de la Granja Docente y Experimental de Pequeños Rumiantes de la Escuela Politécnica Superior de Orihuela.

Los animales estaban en un sistema de producción intensivo, alojándose en un corral de 100 m² con acceso durante todo el día a una zona al aire libre (Figura 1). Los animales se alimentaron durante las dos lactaciones que duraron los estudios con 2,5 kg de ración completa (Unifeed) repartidos en dos tomas al día con libre acceso a paja y agua. La dieta proporcionada a los animales estuvo basada principalmente en heno de alfalfa, maíz, soja, cebada y trigo.

El ritmo reproductivo practicado en la granja fue de un parto al año, introduciendo un macho por cada 10 hembras y permaneciendo 28 días con ellas. Los corderos se mantuvieron con las madres durante un mes y posteriormente fueron destetados y alimentados artificialmente. Después de este tiempo, las madres fueron ordeñadas mecánicamente dos veces al día (8:00 a.m. y 4:00 p.m.) utilizando una máquina de ordeño fabricada por la empresa Gea Farm Technologies (Bönen, Alemania).

Los parámetros de ordeño utilizados fueron, una frecuencia de pulsación de 180 pulsaciones/min, una relación de pulsación del 50%, y un nivel de vacío de 36 KPa. La rutina de ordeño fue de masaje intermedio, con inmersión de los pezones tras el ordeño en una solución de yodo y glicerina.



Figura 1 Ovejas Manchegas en las instalaciones de la UMH.

3. DISEÑO EXPERIMENTAL

Para obtener los datos necesarios para el desarrollo de esta tesis se realizaron dos estudios:

3.1. ESTUDIO 1

En el primer estudio participaron 82 ovejas manchegas, 24 primíparas y 58 multíparas. Tuvo una duración de 3,5 meses, en los que se realizaron 7 toma de muestras a intervalos de 15 días, siendo el primero dos semanas después del parto. Antes del ordeño de la mañana se recogió una muestra de 5 ml de manera aséptica para realizar el análisis microbiológico (Figura 2). A continuación, se ordeñó cada glándula mamaria por separado en un medidor volumétrico para registrar la producción y tomar una muestra de 100 mL de la leche total. Esta muestra se utilizó para el análisis de RCS y de la actividad de la enzima NAGasa tanto en el ordeño de la mañana como en el de la tarde.



Figura 2 Obtención de muestras para bacteriología

3.2. ESTUDIO 2

En el segundo estudio participaron 26 ovejas manchegas. Este experimento duró 7 semanas que se dividieron en dos fases (Figura 3). El primer periodo (preexperimental) duró 1 semana y se seleccionaron 26 animales sanos de las 50 ovejas lactantes de la granja. El segundo período (experimental) duró 6 semanas divididas en 2 etapas. Las dos primeras semanas sirvieron para determinar en qué condiciones sanitarias se encontraban los animales antes del inicio de la infección. Pasadas estas semanas, las ovejas se sometieron a situaciones desfavorables para la salud de la glándula mamaria (SDS) que favorecieron la entrada de los patógenos a través del pezón:

- Ordeño una oveja sana después de otra con IMI reduciendo el diámetro de los tubos cortos de leche y taponando los orificios de las pezoneras.
- Elevación del nivel de vacío de ordeño a 40 kPa.
- Sobreordeño de 3 minutos.
- No bañar los pezones con yodo tras el ordeño.

Después de estas manipulaciones, comenzó la segunda etapa, en la que se analizaron los valores de las variables estudiadas durante 4 semanas, para observar cómo variaban como consecuencia de la aparición de la infección. La metodología para realizar los muestreos fue igual que el experimento 1 pero sólo en los ordeños de la mañana.



Figura 3 Cronología del Estudio 2

4. VARIABLES MEDIDAS EN LA LECHE

El análisis bacteriológico se realizó en las instalaciones de la UMH. Para ello, se sembraron 20 µL de leche, recogida de forma aséptica previa al ordeño, en placas de agar-

sangre de oveja y se incubaron a 37 °C. Se observó el crecimiento de las colonias bacterianas a las 24, 48 y 72 h analizando la densidad, la velocidad de crecimiento, rasgos de las colonias y el aspecto del cultivo. Siguiendo las recomendaciones del National Mastitis Council (Harmon *et al.*, 1990), se consideraron positivos los cultivos con cinco o más colonias idénticas por placa. Se clasificaron como contaminados los cultivos en los que se observó el crecimiento de tres o más colonias diferentes. El género bacteriano se identificó utilizando la tinción de Gram. Para la identificación de la especie bacteriana, en el caso de estafilococos, se utilizó el kit Apistah (BioMerieux, Francia).

El RCS ($\times 1.000$ cel/mL) se analizó en el LICOVAL (Laboratorio Interprofesional Lechero de la Comunidad Valenciana) mediante el método fluoro-opto-electrónico (Modelo Fossomatic 5000, Foss Electric, Hillerød, Denmark) (Figura 4).



Figura 4 Fossomatic 5000

La actividad NAGasa ($\mu\text{M}/\text{min}$ por mL), se analizó en los laboratorios de la UMH siguiendo el método descrito por Kitchen *et al.* (1978) con un espectrofotómetro de fluorescencia (Fluostar Optima, BMG Labtech, Ortenberg, Germany) (Figura 5). Brevemente, este método se basa en la capacidad de la enzima NAGasa liberar 4-metilumbeliferona (4-MU) a partir del sustrato 4-metil-umbeliferil-N-acetil- β -D-glucosaminida (4-MUAG) en un medio ácido. Posteriormente, el 4-MU liberado emite fluorescencia cuando se encuentra en un ambiente alcalino, permitiendo así cuantificar la actividad enzimática de la NAGasa en la muestra de leche.

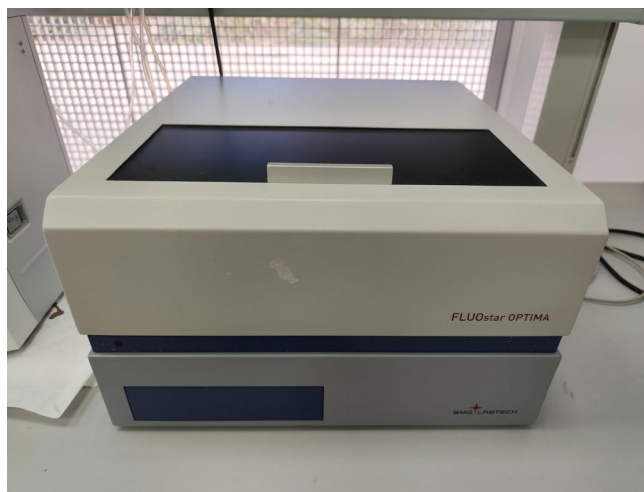


Figura 5 Fluostar Optima

5. CLASIFICACIÓN DE LAS GLÁNDULAS SEGÚN EL ESTADO SANITARIO

En el primer estudio, en base a la experiencia del grupo de investigación y de la literatura revisada (Burriel, 1997; Las Heras *et al.*, 2002), las glándulas se clasificaron según su estado de salud en base en los siguientes criterios: si el RCS era mayor de 400×10^3 cel/mL y el cultivo bacteriológico resultó positivo en dos o más muestreos consecutivos, se consideró que estas glándulas tenían mamitis infecciosa. Si el RCS se mantuvo por encima del mismo valor, pero el análisis bacteriológico fue negativo, se consideró que las glándulas tenían mamitis inespecífica. Si el cultivo bacteriológico resultó positivo, pero el RCS se mantuvo por debajo de 400×10^3 cel/mL, se clasificaron como infección latente. Y si el cultivo bacteriológico fue negativo o positivo solo en un muestreo aislado, y el RCS fue menor de 400×10^3 cel/mL, las glándulas se consideraron como sanas.

En el segundo estudio únicamente se utilizó el cultivo bacteriológico para clasificar las glándulas, las positivas se consideraron como infectadas y las negativas como sanas. Se establecieron 4 grupos sanitarios teniendo en cuenta también el estado de la glándula colateral, GHS=0 glándulas sanas cuya colateral permaneció sana, GHS=1 para las sanas cuya colateral estaba infectada, GHS=2 para glándulas infectadas con la colateral sana y GHS=3 para las infectadas de forma bilateral.

6. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Todos los análisis estadísticos se realizaron utilizando el software R (RCoreTeam, 2021; 4.4.0).

Las distribuciones de variables cuantitativas (NAGasa y RCS) se evaluaron mediante histogramas y diagramas de caja.

Los valores de SCC ($\times 10^3$ cel/mL) y NAGasa ($\mu\text{M}/\text{min}$ por mL) se transformaron utilizando el logaritmo natural para corregir la asimetría de su distribución y asegurar la normalidad de los datos cuando se utilizaron en los modelos de regresión. Sin embargo, en el caso de estadísticas descriptivas o pruebas no paramétricas, se utilizó la variable de escala original para facilitar la interpretación.

Para realizar los análisis descriptivos de las variables cuantitativas (NAGasa y RCS) se utilizó la media (DE) y la mediana (1er, 3er cuartil), mientras que para las variables categóricas se usaron las frecuencias absolutas y relativas.

La correlación entre las variables cuantitativas NAGasa y RCS se evaluó utilizando el coeficiente de correlación bootstrapping mediante la biblioteca R rmcrr (Bakdash y Marusich, 2023), dada la no independencia de las observaciones. Los intervalos de confianza se calcularon utilizando bootstrapping ya que no requiere supuestos distribucionales.

En el primer estudio, la correlación entre la NAGasa y el RCS se calculó globalmente, separando por los dos horarios de ordeño (mañana, tarde) y teniendo en cuenta los niveles de RCS ($< 200 \times 10^3$, entre 200×10^3 y 400×10^3 y $> 400 \times 10^3$ cel/mL) para evaluar el grado de correlación en cada uno de los horarios y nivel de RCS.

En el segundo estudio, la correlación entre las dos variables se calculó globalmente, considerando los niveles de RCS ($\leq 400 \times 10^3$ y $> 400 \times 10^3$ cel/mL), así como para cada período.

En el Estudio 1, se realizaron comparaciones univariantes múltiples mediante modelos de regresión mixta. Posteriormente, se realizaron comparaciones múltiples dos a dos mediante la prueba de Tukey y la corrección de Bonferroni. En el Estudio 2, se realizaron comparaciones univariantes entre el estado sanitario de la glándula en diferentes puntos temporales. Los valores p se ajustaron mediante la corrección de Holm para comparaciones múltiples.

Para el análisis inferencial de los factores considerados en el primer estudio (etapa de lactación, número de parto, ordeño y estado sanitario), se realizó un análisis de

regresión lineal mixta usando el log NAGasa considerando que es una variable cuantitativa continua y la correlación entre mediciones repetidas del mismo animal (estructura de covarianza). Los efectos considerados en este estudio fueron: estado de lactación (Muestreo: 1, 2, 3, 4, 5, 6 y 7), número de parto (primípara o múltipara), sesión de ordeño (mañana o tarde), estado de salud de la glándula (sana, mastitis infecciosa, mastitis no específica o infección latente) y sus interacciones de primer orden. El efecto aleatorio de la glándula (derecha o izquierda) anidada a la oveja se indicó en el modelo para explicar la agrupación de las glándulas mamarias dentro de los animales. Se informó la DE de intra-oveja e inter-oveja. Se utilizó una estructura de covarianza no estructurada para dar cuenta de las mediciones repetidas de los animales.

Para el análisis inferencial del segundo estudio, se realizó un análisis de regresión lineal mixta considerando la NAGasa transformada logarítmicamente como variable dependiente, siendo las variables independientes: días respecto al inicio de la infección (14-7 días previos, 3 días previos, 4 días posteriores, 7-14 días posteriores y 21-28 días posteriores al establecimiento de la infección), la variable RCS transformada logarítmicamente y el estado de salud de la glándula (sana o infectada). Se incluyó la interacción de primer orden entre el estado de salud de la glándula y el período de tiempo con respecto al momento del inicio de la infección. El efecto aleatorio de las glándulas (derecha o izquierda) anidadas en la oveja se consideró en el modelo para explicar la agrupación de las glándulas mamarias dentro de los animales. Se utilizó un ajuste de correlación de tipo "proceso autorregresivo de orden 1" para modelizar la estructura de varianza entre medidas repetidas del mismo animal y glándula. En ambos estudios, el modelo final proporcionó el mejor ajuste a los datos en comparación con otros modelos que consideraron otras covarianzas y estructuras jerárquicas (evaluadas mediante el criterio de información de Akaike).

Para evaluar la capacidad predictiva de NAGasa y otros factores considerados (estado de lactación, número de parto, turno de ordeño y producción de la glándula), se desarrollaron modelos de regresión logística para predecir la IMI. Para comparar la capacidad predictiva de NAGasa con el RCS, también se desarrollaron modelos de regresión logística con RCS. La capacidad predictiva de los modelos se evaluó utilizando el área bajo la curva (AUC), el R^2 de Nagelkerke y el valor umbral para el cual se calcularon la sensibilidad, la especificidad, la precisión, el valor predictivo positivo y el valor predictivo negativo.

En el Estudio 1 los modelos que se consideraron fueron:

- Modelo 1: log NAGasa + estado lactación + número parto + ordeño + producción.
- Modelo 2: log NAGasa + estado lactación + número parto + ordeño
- Modelo 3: log NAGasa + estado lactación + número parto + producción
- Modelo 4: log NAGasa + estado lactación + ordeño + producción.
- Modelo 5: log NAGasa + estado lactación + número parto
- Modelo 6: log RCS + estado lactación + número parto + ordeño + producción.
- Modelo 7: log NAGasa + log RCS+ estado lactación + número parto + ordeño + producción.

En el Estudio 2 se utilizaron únicamente los datos de los 4 días posteriores a la infección, dado que se esperaba que la infección incrementase la NAGasa y la utilidad buscada de una detección temprana. Se propusieron 18 modelos, 6 reglas (4 basadas en detectar desviaciones porcentuales -5, 10, 20 ó 30%- respecto a los valores previos a la infección Regla 1, y otras 2 basadas en detectar desviaciones de 2 ó 3 veces la desviación estándar respecto a los valores previos: Regla 2):

- Regla 1 (R1): la glándula se clasificó como positiva para cada día en que el valor de NAGasa superó en un 5, 10, 20 o 30% el valor medio de referencia de los 3 días anteriores a las SDS.
- Regla 2 (R2): la glándula se clasificó como positiva para cada día cuando la desviación de la actividad de la NAGasa respecto al valor medio de referencia de los tres días anteriores a las SDS superó más de 2 o 3 veces la desviación estándar de esos 3 días previos a las SDS.

Tras clasificar las muestras de NAGasa como positivas o negativas en cada uno de los primeros cuatro días de seguimiento después de la exposición a SDS, según estos dos enfoques, se contemplaron tres estrategias:

- Estrategia Any: la glándula se consideró positiva si en al menos uno de los primeros cuatro días después de la infección se superó el umbral establecido según las reglas R1 y R2; de lo contrario, se clasificó como negativa.
- Estrategia Some2: la glándula se clasificó como positiva cuando al menos en dos de los cuatro primeros días de seguimiento se superó el umbral correspondiente en cada regla, de lo contrario la glándula se consideró negativa.

- Estrategia Some3: la glándula se consideró positiva si en al menos tres de los primeros cuatro días después de la infección se superó el umbral establecido según las reglas R1 y R2; de lo contrario, se clasificó como negativa.

Los análisis se realizaron utilizando las bibliotecas nlme (Pinheiro *et al.*, 2021), rms (Harrell, 2022), Calibration Curves (De Cock *et al.*, 2023) y el software estadístico R (R Core Team, 2021; 4.4.0). Un valor $p < 0,05$ se consideró estadísticamente significativo.



IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

1. ESTUDIO 1

La prevalencia de mamitis observada en este estudio fue del 13-20%, siendo entre el 7 y el 9% de glándulas con mastitis infecciosa, entre el 0-30% de mamitis inespecíficas y entre el 6 y el 11% de glándulas con infección latente, según el momento observado. Este resultado fue similar a la de otros trabajos como el de McDougall *et al.* (2002), quienes observaron una prevalencia del 19% al inicio de la lactancia o Al-Majali y Jawabreh (2003) quienes obtuvieron un 10%. Los porcentajes se mantuvieron estables a lo largo de la lactación, lo cual concuerda con Leitner *et al.* (2001), que observaron que en el 90% de los casos, el estado de salud de las glándulas se mantuvo estable durante toda la lactancia. La prevalencia fue mayor en hembras multíparas (19–23%) que en primíparas (0–6%), coincidiendo con otros estudios como el de Leitner *et al.* (2003) o el de Al-Majali y Jawabreh (2003).

Los patógenos que se aislaron de manera más frecuente fueron los estafilococos (96,9%), siendo *S. xylosus* y *S. lentus* los más habituales (33,8 y 21,5%, respectivamente), estos resultados coinciden con McDougall *et al.* (2002) quienes observaron que fueron los estafilococos los que causaron todas las mastitis subclínicas. Los valores más altos de NAGasa y RCS se encontraron en las glándulas infectadas por *S. aureus* (223,7 $\mu\text{M}/\text{min}$ por mL y $13,8 \times 10^6$ cel/mL), lo que coincide con Contreras *et al.* (2007), quienes observaron que esta bacteria podría causar signos clínicos graves. Los valores de NAGasa y RCS del resto de estafilococos coagulasa-negativos fueron inferiores a los producidos por los patógenos mayores, lo que está de acuerdo con lo descrito por Leitner *et al.* (2001). Los valores más bajos se obtuvieron en las glándulas infectadas con *S. lentus*, resultando inferiores a los obtenidos en las glándulas sanas (16,6 $\mu\text{M}/\text{min}$ por mL, $61,5 \times 10^3$ cel/mL y 34,2 $\mu\text{M}/\text{min}$ por mL, 69×10^3 cel/mL, respectivamente).

Con respecto al estudio de los factores de variación mediante el análisis de regresión lineal mixto, la infección de la glándula mamaria fue el factor que tuvo un mayor efecto sobre la actividad de la NAGasa. Los valores más altos se encontraron en las glándulas con mastitis infecciosa tanto en las hembras multíparas ($d = 0,67$, $p = 0,026$) como en las primíparas ($d = 0,63$, $p = 0,025$), seguidos por los de las glándulas con mastitis no específica ($d = 0,60$, $p < 0,001$ y $d = 0,21$, $p = 0,169$ para multíparas y primíparas respectivamente), y por último, por los de las glándulas con infección latente ($d = 0,01$, p

= 0,983 y $d = 0,20$, $p = 0,575$, para multíparas y primíparas respectivamente), aunque únicamente hubieron diferencias significativas entre las sanas y las glándulas con mastitis infecciosa en las hembras multíparas y primíparas y entre las sanas y las mastitis inespecíficas de las multíparas. Estos resultados corresponden con los esperados, debido a que las glándulas con mastitis infecciosa sufrieron una inflamación y una infección que pudo provocar un aumento en la destrucción celular liberando mayor cantidad de NAGasa. Los valores de las no específicas fueron más bajos, ya que solo presentaron inflamación, pero aun así fueron más altos que las que sufrieron infección latente, ya que presentaron niveles más bajos de RCS y probablemente una infección intramamaria poco severa que sólo causó daño a los lactocitos de manera leve. Estos resultados concuerdan con los observados para la NAGasa en vacas por Kitchen *et al.* (1984), quienes encontraron diferencias estadísticamente significativas según se considerara la glándula sana (bacteriología negativa y $RCS < 500 \times 10^3$ cel/mL, 18,3 $\mu\text{mol/L}$ por min), con infección latente (bacteriología positiva y $RCS < 500 \times 10^3$ cel/mL, 20,6 $\mu\text{mol/L}$ por min), con mastitis inespecífica (bacteriología negativa y $RCS > 500 \times 10^3$ cel/mL, 55,8 $\mu\text{mol/L}$ por min) o con mastitis específica (bacteriología positiva y $RCS > 500 \times 10^3$ cel/mL, 62,1 $\mu\text{mol/L}$ por min). En ovejas, Leitner *et al.* (2001) obtuvieron valores de 0,855 $\mu\text{mol/L}$ por min en las glándulas sanas, valores de 3,37 $\mu\text{mol/L}$ por min en glándulas infectadas con estafilococos coagulasa negativos y de 4,89 $\mu\text{mol/L}$ por min en las infectadas con estreptococos.

Al analizar la variación de los valores de NAGasa según los factores no infecciosos, se observaron diferencias significativas en todos ellos. Respecto al estado de lactación, los valores más altos se obtuvieron en el primer muestreo, disminuyendo hasta la tercera toma de muestras ($d = -0,36$, $p < 0,001$) para luego volver a aumentar de manera gradual hasta alcanzar un máximo en el séptimo muestreo ($d = 0,18$, $p = 0,011$). Esto puede ser debido a los cambios fisiológicos y hormonales que experimenta la oveja en esos momentos, y que produce un aumento de leucocitos después del parto y antes del período seco (Fruganti *et al.*, 1985). También puede deberse al efecto de la dilución, Fuertes *et al.* (1998) observaron que la curva de los niveles del RCS estaba inversamente relacionada con la de la producción de leche, registrando el valor mínimo de RCS en la quinta semana posparto, coincidiendo con la máxima producción de leche. Nuestros resultados coinciden con lo reportado por Hovinen *et al.* (2016) en vacas, quienes observaron que, en animales con mastitis, la actividad de NAGasa era más alta durante los primeros 30 días de

lactación, disminuyendo de manera gradual hasta los 100 días posparto, a partir de cuando tiende a aumentar de nuevo. En ovejas, Moroni y Cuccuru (2001) encontraron que, tanto en animales sanos como con mamitis, la actividad enzimática fue más alta al final de la lactancia que al principio. Estos resultados son diferentes a los de Leitner *et al.* (2001), quienes no detectaron diferencias en los valores de NAGasa en función del momento de lactación ni para las glándulas sanas ni para las infectadas.

Al estudiar el efecto del número de parto sobre los valores de NAGasa, en comparación con las sanas se obtuvieron valores más altos en las glándulas con mamitis infecciosa de las hembras multíparas ($d = 0,67$, $p = 0,026$) que en las de las primíparas ($d = 0,63$, $p = 0,025$). Esto podría ser debido a que las ovejas multíparas han tenido una mayor exposición a patógenos mamarios a lo largo de su vida, por lo que existe una mayor reacción de su sistema inmune. Este resultado es similar al observado en vacas por Chagunda *et al.* (2006), quienes observaron que, en las glándulas infectadas los valores más bajos se encontraron en vacas primíparas.

Respecto al efecto del ordeño, aunque se obtuvieron los niveles más bajos de NAGasa en el ordeño de la tarde ($d = -0,09$, $p = 0,004$), las mayores diferencias entre los distintos estados sanitarios de las glándulas también se dieron en el ordeño vespertino. En cualquier caso, las diferencias fueron tan pequeñas que no resultaron biológicamente relevantes, por lo que se podría medir la enzima indistintamente en cualquiera de las dos sesiones de ordeño. Esto coincide con lo observado en ovejas por Leitner *et al.* (2003), cuyos resultados no fueron concluyentes respecto a la actividad de NAGasa en función del momento del ordeño y por Åkerstedt *et al.* (2011) en vacas, quienes observaron pequeñas diferencias entre ordeños.

En este estudio, también se analizó la correlación entre la NAGasa y el RCS, tanto de manera global, como por intervalos de RCS (inferiores a 200×10^3 cel/mL, entre 200×10^3 y 400×10^3 cel/mL, y superiores a 400×10^3 cel/mL) y sesión de ordeño (mañana o tarde). La mayor correlación se obtuvo en el ordeño vespertino de la muestra global ($r = 0,48$), que fue significativamente mayor que en el ordeño matutino de la misma muestra ($r = 0,29$). Esto puede ser debido a que el menor intervalo entre ordeños da lugar a una menor producción que implica una mayor concentración de componentes. Este resultado es similar a los encontrados en otros estudios en vacas, como el de Chagunda *et al.* (2006), en el que encontraron correlaciones de $r = 0,41$ entre ambos parámetros en glándulas sanas siendo mayor en glándulas con mastitis ($r = 0,59$). Otros trabajos han obtenido

correlaciones más altas en glándulas con mastitis subclínica ($r = 0,73$), pero sin encontrar la correlación entre ellas en glándulas sanas (Hovinen *et al.*, 2016), lo que corrobora que una parte importante de la actividad de NAGasa proviene de células epiteliales de ubre dañadas y leucocitos (Kitchen *et al.*, 1978). En ovejas, Leitner *et al.* (2001) obtuvieron un coeficiente de correlación de 0,85 entre NAGasa y RCS.

Al estudiar la correlación entre la producción de leche y la NAGasa, se observó que existía una correlación negativa estadísticamente significativa entre las dos variables ($r = -0,39$). Estos resultados concuerdan con Leitner *et al.* (2004b), los cuales observaron que la producción de leche era mayor en ovejas con ambas glándulas sanas que en animales con una glándula con mamitis, y que en ovejas con las dos glándulas infectadas (2,88, 2,80 y 1,81 kg/día, respectivamente). Martí de Olives *et al.* (2013) detectaron que la disminución de la producción de leche variaba en función de la severidad de la infección, siendo más pronunciada a medida que aumentaban los niveles de RCS.

Por último, también se estudió la capacidad predictiva de la enzima mediante el uso de distintos algoritmos. Los modelos con mayor capacidad predictiva (AUC 0,80) fueron los modelos 1, 2, 3, 5 y 7. El modelo 1 incluyó la NAGasa y todas las variables de estudio (estado de lactación, parto, ordeño y producción), en el 2 se excluyó la producción, en el 3 se excluyó el ordeño y en el 5 se excluyeron el ordeño y la producción al mismo tiempo, el modelo 6 incluía el log RCS en lugar de log NAGasa, y el modelo 7 era como el 1 más el log RCS. La capacidad predictiva de los modelos 2, 3 y 5 fue la misma que la del modelo 1 (0,80), que incluyó todos los factores, lo que indica que estos factores no mejoran la capacidad predictiva del modelo. En el modelo 7, se sumó el RCS al modelo 1, pero tampoco mejoró la capacidad predictiva (AUC 0,80). En el modelo 6 se sustituyó la NAGasa por RCS en el modelo 1, lo cual empeoró ligeramente la capacidad predictiva de los modelos anteriores, ya que se obtuvo un valor de AUC inferior (0,78). En el modelo 4, en el que se excluyó el número de parto, el AUC disminuyó a 0,74, lo que indica que esta variable aporta información relevante a la hora de clasificar la IMI.

El modelo que presentó la sensibilidad y especificidad combinada más alta fue el número 7 (73% y 71%), seguido con valores muy similares por los modelos 1, 2, 3 y 5. Los modelos 1 y 2 reportaron una sensibilidad del 64% y una especificidad del 79%. En los modelos 3 y 5 los valores fueron muy similares, pero con un pequeño aumento de la sensibilidad a expensas de la especificidad (sensibilidad del 72 y 73% y especificidad del 71 y 70%). El modelo 6 tuvo un valor combinado de sensibilidad y especificidad

ligeramente inferior a los modelos anteriores con el valor de especificidad más alto (96%) y el valor de sensibilidad más bajo (45%). Finalmente, el modelo 4, obtuvo los valores de sensibilidad y especificidad general más bajos (67% y 72%). Los valores de sensibilidad y especificidad obtenidos, son más bajos que los observados en otros estudios sobre bovinos. Por ejemplo, Hovinen *et al.* (2016) lograron una sensibilidad del 85% y una especificidad del 84% para distinguir entre glándulas mamarias sanas y aquellas con mamitis subclínica. En el caso del ganado ovino, aunque no se dispone de estudios específicos sobre modelos predictivos de NAGasa, Clements *et al.* (2003) utilizando el California Mastitis Test como método de diagnóstico, observaron que al aumentar el umbral del recuento de células somáticas, la especificidad para detectar mamitis mejoraba, mientras que la sensibilidad disminuía. Berthelot *et al.* (2006) obtuvieron una especificidad del 75% y una sensibilidad del 82% a la hora de clasificar animales con mamitis, considerando que una glándula se consideraba sana si en todos los muestreos el RCS era inferior a 500×10^3 cel/mL y que se consideraba infectada si en al menos dos muestreos el RCS era superior a $1-1,2 \times 10^6$ cel/mL.

Según los resultados obtenidos, cualquiera de los modelos 1, 2, 3, 5 y 7 podría ser utilizado para la detección de mamitis, ya que son muy similares tanto para AUC, como para valores de sensibilidad y especificidad. Los modelos 1 y 2 son los que tienen mayor especificidad, mientras que el modelo 5, que incluye menos variables que los demás, y tiene la mayor sensibilidad y el mismo AUC que otros modelos más complejos. La elección de un modelo u otro, dependerá de las necesidades de cada explotación, ya que una mayor prevalencia de la enfermedad puede requerir una mayor sensibilidad. Si se prioriza la especificidad frente a la sensibilidad se obtiene una menor tasa de falsos positivos por lo habrá una reducción de costes veterinarios por tratamientos innecesarios. El modelo 5, al tener resultados similares a los más complejos pero incluyendo menos variables, lo cual conllevaría una reducción en los costes del análisis, podría ser el algoritmo más adecuado para su uso a nivel de explotación utilizando biosensores como los propuestos para vacas por Kumar *et al.* (2020) o Nirala y Shtenberg (2021) que ayudarían en la detección precoz de la enfermedad.

2. ESTUDIO 2

En este experimento se observó una incidencia del 42,3% a nivel de glándula, que coincidió con la prevalencia tras las situaciones desfavorables para la salud de la glándula

(SDS) al haber partido de animales sanos. Este valor es superior a la media que encontramos normalmente en la literatura, aunque estos valores varían bastante en función de la fuente consultada. Hay estudios con valores muy bajos del 4,6% (McDougall *et al.*, 2001), valores medios del 19,3% (Caria *et al.*, 2016), valores parecidos a los obtenidos en este trabajo de 39,9% (Leitner *et al.*, 2001), e incluso con valores superiores del 53% (Tzanidakis *et al.*, 2021). La elevada prevalencia observada en este estudio podría explicarse por las condiciones desfavorables a las que se sometió de manera intencionada la glándula mamaria, lo que aumentó la probabilidad de que las glándulas desarrollaran una infección. En estudios con un diseño similar en el que también se practicaron SDS en cabras, se obtuvo una incidencia del 33,3% a nivel de glándula (Díaz *et al.*, 2012).

El 71,4% de las glándulas fueron infectadas por enterobacterias y un 28,6% por estafilococos. Estos valores no corresponden a lo observado en la bibliografía cuando las infecciones se producen de manera natural, el porcentaje de mamitis producidas por enterobacterias suele ser mucho más bajo y los estafilococos son los que producen el mayor porcentaje de infecciones intramamarias, Vasileiou *et al.* (2019b) obtuvieron porcentajes de 3,4% y 69,8% respectivamente, Dore *et al.* (2016) de 3,8% y 53,4% y Queiroga (2017) de 0,9% y 76,6%. Esto puede ser debido, a que como consecuencia de las situaciones desfavorables que se provocaron en las glándulas mamarias, se facilitó la entrada de bacterias presentes en el medio ambiente que rodeaba a la oveja (la cama, el suelo, estiércol) que pudieron entrar en contacto con la piel de la glándula y posteriormente colonizar el interior.

Respecto al efecto del inicio de la infección intramamaria sobre la NAGasa, los valores más bajos en cada uno de los cuatro grupos según el estado de salud de la glándula se observaron en todos los días previos a la realización de las situaciones no saludables para la glándula mamaria (27,44–61,46 $\mu\text{M}/\text{min por mL}$). Tanto en las glándulas sanas (GHS=0) como en las sanas cuya colateral estaba infectada (GHS=1), se observó una tendencia al aumento progresivo de los valores de la enzima a medida que avanzaba el estado de lactación, el primer control se realizó unos días antes de las 6 semanas posteriores al parto y el último a las 12 semanas. Esta tendencia corrobora el Estudio 1 en el que se observó que a partir de la semana 6 tras el parto, la NAGasa tendía a elevarse de forma fisiológica hasta la semana 14 (Miralles *et al.*, 2024). En las glándulas infectadas con la colateral sana (GHS=2) y en las infectadas de forma bilateral (GHS=3), se produjo

un aumento muy acusado de los valores de NAGasa en los 4 días siguientes al inicio de la infección: 95,59 $\mu\text{M}/\text{min}$ por mL para GHS=2 y 105,69 $\mu\text{M}/\text{min}$ por mL para GHS=3. Estos resultados coinciden con gran cantidad de estudios en los que se ha observado que la infección aumenta los valores de NAGasa tanto en vacas (Hovinen *et al.*, 2016), cabras (Nagahata *et al.*, 2022) y ovejas (Leitner *et al.*, 2004c). Los valores de las glándulas con infección unilateral se incrementaron un 50% en comparación con los registrados tres días antes de la infección, mientras que en las glándulas con infección bilateral el aumento fue casi cuatro veces mayor. Esto parece indicar que las infecciones que afectan a las dos glándulas pueden desencadenar una respuesta inflamatoria local más intensa, posiblemente como consecuencia de una respuesta sistémica mayor (Hovinen *et al.*, 2016). Los valores de NAGasa disminuyeron en los dos muestreos siguientes, pero se mantuvieron por encima de los niveles obtenidos en los días previos a la infección en las glándulas infectadas bilateralmente. Se obtuvieron valores de 76,49 $\mu\text{M}/\text{min}$ por mL para GHS=2 y 54,47 $\mu\text{M}/\text{min}$ por mL para GHS=3 en los siguientes 7–14 días, y de 64,84 $\mu\text{M}/\text{min}$ por mL para GHS=2 y 59,85 $\mu\text{M}/\text{min}$ por mL para GHS=3 para los siguientes 21–28 días. Esta elevación tan marcada después de la infección, seguida de una posterior estabilización, podría atribuirse a que la carga microbiana fuera baja, y a que los animales se encontraran en un estado inmunológico elevado, permitiéndoles combatir la infección rápidamente. Estos resultados coinciden con otros autores, que observaron que la prevalencia de la mamitis disminuía a lo largo de la lactación del 19% hasta el 9,1% en el día 40, indicando que el 93,8% de las ovejas se curaron espontáneamente (McDougall *et al.*, 2002), y con otros estudios en los que se observó una reducción de la prevalencia con el progreso de la lactación (Bergonier *et al.*, 2003; Leitner *et al.*, 2008).

Al analizar la correlación entre el RCS y la NAGasa, según intervalos de RCS (mayor o inferior a 400.000 cel/mL) se encontró una correlación positiva alta cuando se analizaron los valores de forma global ($r = 0,79$) coincidiendo con la obtenida en otros estudios, tanto en ovinos ($r = 0,85$) (Leitner *et al.*, 2001) como en bovinos ($r = 0,73$) (Hovinen *et al.*, 2016). Al estudiar los valores por separado en función del número de células somáticas, se observó que la correlación disminuyó, obteniéndose valores más altos cuando el RCS fue superior a 400×10^3 cel/mL ($r = 0,65$) que cuando el valor de RCS fue inferior o igual a 400×10^3 cel/mL ($r = 0,41$). Durante todo el estudio la correlación se mantuvo positiva, los valores más altos se obtuvieron a los 4 y 7-14 días tras la infección ($r = 0,76$ y $r = 0,61$), coincidiendo con los momentos en los que el RCS alcanzó los valores

más altos. Los valores más bajos se obtuvieron 14-7 días antes y 21-28 días después de la infección ($r = 0,31$ y $r = 0,33$).

En este estudio también se analizó el valor predictivo de algoritmos que incluyeron la NAGasa para detectar infección intramamaria. Al estudiar los resultados de los modelos predictivos, se observó que en general, la Regla 1-5% no funcionaba bien, presentando una baja especificidad, debido a la dispersión de los valores de NAGasa, siendo fácil que se desvíen en más de un 5% sin la presencia de IMI, por lo que genera falsos positivos. Los mejores resultados se obtuvieron para la estrategia Some2 (R1-30% y R2-3SD) y la estrategia Some3 (todas excepto R1-5%), con valores de AUC mayores de 0,85. En la estrategia Some2, la Regla 1-30%, obtuvo un AUC de 0,90 y clasificó correctamente el 89,8% de las observaciones, asegurando una sensibilidad del 95,2% y una especificidad del 85,7%, y la Regla 2-3SD, con un AUC de 0,86, clasificó correctamente el 87,8% de las observaciones, asegurando una sensibilidad del 85,7% y una especificidad del 89,3%. En la Estrategia Some3, todas las reglas ofrecieron buenos resultados a excepción de la Rule 1-5%. La Regla 1-10% con un AUC de 0,85, clasificó correctamente el 83,7% de las observaciones, asegurando una sensibilidad del 95,2% y una especificidad del 75%; la Regla 1-20% con un AUC de 0,86, obtuvo una precisión del 85,7%, asegurando una sensibilidad del 90,5% y una especificidad del 82,1%; la Regla 1-30%, con un AUC de 0,87, clasificó correctamente el 87,8% de las observaciones, asegurando una sensibilidad del 81% y una especificidad del 92,9%; la Regla 2-2SD, con un AUC de 0,86, obtuvo una precisión del 85,7%, asegurando una sensibilidad del 85,7% y una especificidad del 85,7%; y finalmente, la Regla 2-3SD, con un AUC de 0,87, clasificó correctamente el 87,8% de las observaciones asegurando una sensibilidad del 81% y una especificidad del 92,9%.

Para elegir cual podría resultar como el mejor algoritmo, se debe tener en cuenta si se necesita una mayor sensibilidad o una mayor especificidad. Esto va a depender de la prevalencia de IMI que tengamos en el rebaño, si la prevalencia es baja, sería recomendable priorizar más la especificidad para evitar tratamientos innecesarios (Romero *et al.*, 2014). Aunque muchas de las reglas de la estrategia Some2 y de la estrategia Some3 darían buenos resultados, el modelo más completo a nivel global con un mayor valor de AUC (0,90), una mayor sensibilidad (95,2%) y un buen valor de especificidad (85,7%) es el -R1-30% de la estrategia Some2. En el caso de que necesitemos una mayor especificidad, los modelos R1-30% y R2-3SD de la estrategia

Some3 son los que manteniendo buenos valores de sensibilidad (81%) presentan los valores más elevados de especificidad (92,9%). Estos resultados son superiores a los obtenidos en estudios en vacas, en los que se obtuvo una sensibilidad del 85% y una especificidad del 84% (Hovinen *et al.*, 2016). En ovejas no existen estudios sobre modelos predictivos de NAGasa, pero los resultados obtenidos en este trabajo superan a los observados en el Estudio 1 de esta tesis, en el que se obtuvo un valor de AUC de 0,80, una sensibilidad entre el 64 y el 73% y una especificidad entre el 70 y el 79% (Miralles *et al.*, 2024).



V. CONCLUSIONES

De los resultados obtenidos en ambos estudios, se concluye que son diversos los factores no infecciosos que afectan a la NAGasa en leche (estado de lactación, número de parto o sesión de ordeño), siendo el estado sanitario de la glándula el que tienen una mayor influencia y la sesión de ordeño el que menos. Existe una correlación significativa y positiva con el RCS, variable utilizada como referencia para clasificar las glándulas según su estado sanitario, en gran parte de la bibliografía. En cuanto al estado sanitario de la glándula mamaria, el contenido en la enzima NAGasa es superior en las glándulas con mastitis infecciosa, seguidas de infección inespecífica y latente, obteniendo los menores valores las glándulas consideradas sanas.

Respecto al empleo de la NAGasa para la detección de la infección de la glándula mamaria dentro de los primeros 4 días después de la instauración de la infección, fueron varios los algoritmos que mostraron una capacidad predictiva y precisión altas, y buenos valores de sensibilidad y especificidad. La elección del algoritmo dependerá de las necesidades de las explotaciones en función de si necesitan priorizar la especificidad o la sensibilidad.

Como conclusión final, la medición de la NAGasa en leche diariamente y su incorporación en algoritmos permite una detección temprana de la enfermedad, lo que junto con un tratamiento temprano puede ayudar a reducir las pérdidas económicas, la severidad de la enfermedad y aumentar el bienestar animal.

VI. REFERENCIAS

- Abdelgawad, A.R.; Rovai, M.; Caja, G.; Leitner, G.; Castillo, M. 2016. Evaluating coagulation properties of milk from dairy sheep with subclinical intramammary infection using near infrared light scatter. A preliminary study. *Journal of Food Engineering*. 168: 180–190.
- Addis, M.F.; Pisanu, S.; Marogna, G.; Cubeddu, T.; Pagnozzi, D.; Cacciotto, C.; Campesi, F.; Schianchi, G.; Rocca, S.; Uzzau, S. 2013. Production and release of antimicrobial and immune defense proteins by mammary epithelial cells following *Streptococcus uberis* infection of sheep. *Infection and Immunity*. 81: 3182–3197.
- Addis, M.F.; Tedde, V.; Dore, S.; Pisanu, S.; Puggioni, G.M.G.; Roggio, A.M.; Pagnozzi, D.; Lollai, S.; Cannas, E.A.; Uzzau, S. 2016. Evaluation of milk cathelicidin for detection of dairy sheep mastitis. *Journal of Dairy Science*. 99: 6446–6456.
- Åkerstedt, M.; Forsbäck, L.; Larsen, T.; Svennersten-Sjaunja, K. 2011. Natural variation in biomarkers indicating mastitis in healthy cows. *Journal of Dairy Research*. 78: 88–96.
- Albenzio, M.; Taibi, L.; Muscio, A.; Sevi, A. 2002. Prevalence and etiology of subclinical mastitis in intensively managed flocks and related changes in yield and quality of ewe milk. *Small Ruminant Research*. 43: 219–226.
- Albenzio, M.; Marino, R.; Caroprese, M.; Santillo, A.; Annicchiarico, G.; Sevi, A. 2004. Quality of milk and Canestrato Pugliese cheese from ewes exposed to different ventilation regimens. *Journal of Dairy Research*. 7: 434–443.
- Albenzio, M.; Caroprese, M.; Santillo, A.; Marino, R.; Muscio, A.; Sevi, A. 2005. Proteolytic patterns and plasmin activity in ewe milk as affected by somatic cell count and stage of lactation. *Journal of Dairy Research*. 72: 86–92.
- Al-Majali, A.M.; Jawabreh, S. 2003. Period prevalence and etiology of subclinical mastitis in Awassi sheep in southern Jordan. *Small Ruminant Research*. 47: 243–248.
- Amorena, B.; Tejedor, T. 1990. Perspectivas actuales de la selección para la resistencia a la mamitis. *Medicina Veterinaria*. 7: 519–530.
- Anderson, D. E.; Hull, B. L.; Pugh, D. G. 2002. Sheep and Goat Medicine. In: Pugh D. G. (Ed.). *Sheep and goat medicine*. Philadelphia: W.B. Saunders. pp.341–358

- Antonič, J.; Jackuliaková, L.; Uhrinča, M.; Mačuhová, L.; Oravcová, M.; Tančin, V. 2013. Changes in milk yield and composition after lamb weaning and start of machine milking in dairy ewes. *Slovak Journal Animal Science*. 46: 93-99.
- Arias, R.; Oliete, B.; Ramón, M.; Arias, C.; Gallego, R.; Montoro, V.; Gonzalo, C.; Pérez-Guzmán, M.D. 2012. Long-term of environmental effects on test-day somatic cell count and milk yield in Manchega sheep. *Small Ruminant Research*. 106: 92-97.
- Ariznabarreta, A. 1999. El recuento celular de la leche como método indirecto de diagnóstico de mastitis subclínicas en el ganado ovino de raza Churra. Tesis Doctoral, Univ. León, Spain.
- Babaei, H.; Mansouri-Najand, L.; Molaei, M.M.; Kheradmand, A.; Sharifan, M. 2007. Assessment of lactate dehydrogenase, alkaline phosphatase and aspartate aminotransferase activities in cow's milk as an indicator of subclinical mastitis. *Veterinary Research Communications*. 31: 419-425.
- Bakdash, J.; Marusich, L. 2023. rmcrr: Repeated Measures Correlation. R package version 0.6.0. Retrieved on 17 on January 2023 from <https://CRAN.Rproject.org/package=rmcrr>.
- Bansal, B.K.; Hamann, J.; Grabowski, N.T. y Singh, K.B. 2005. Variation in the composition of selected milk fraction samples from healthy and mastitic quarters, and its significance for mastitis diagnosis. *Journal Dairy Research*. 72: 144-52.
- Barillet, F.; Rupp, R.; Mignon-Grasteau, S.; Astruc, J.; Jacquin, M. 2001. Genetic analysis for mastitis resistance and milk somatic cell score in french lacune dairy sheep. *Genetics Selection Evolution*. 33: 397.
- Barth, K.; Aulrich, K.; Müller, U.; Knappstein, K. 2010. Somatic cell count, lactoferrin and NAGase activity in milk of infected and non-infected udder halves of dairy goats. *Small Ruminant Research*. 94: 161-166.
- Bergonier, D.; Berthelot, X. 2003. New advances in epizootiology and control of ewe mastitis. *Livestock Production Science* 79: 1–16.
- Bergonier, D.; De Cremoux, R.; Rupp, R.; Lagriffoul, G.; Berthelot, X. 2003. Mastitis of dairy small ruminants. *Veterinary Research*. 34: 689-716.
- Berning, L.M. and Shook, G.E. 1992. Prediction of mastitis using milk somatic cell count, N-acetyl-B-D-glucosaminidase and lactose. *Journal Dairy Science*. 75: 1840-1848.

- Berthelot, X.; Lagriffoul, G.; Concordet, D.; Barillet, F.; Bergonier, D. 2006. Physiological and pathological thresholds of somatic cell counts in ewe milk. *Small Ruminant Research*. 62: 27–31.
- Bianchi, L.A.; Bolle, E.; Budelli, A.; Caroli, C.; Casoli, M.; Pauselli, E. Duranti. 2004. Effect of udder health status and lactation phase on the characteristics of Sardinian ewe milk. *Journal Dairy Science*. 87: 2401-2408.
- Boosman, R.; Niewold, Th.A.; Mutsaers, C.W.A.A.M.; Gruys, E. 1989. Serum amyloid A concentrations in cows given endotoxin as acute-phase stimulant, *Am. Journal Veterinary Research*. 50: 1690–1694.
- Brenaut, P.; Lefèvre, L.; Rau, A.; Laloë, D.; Pisoni, G.; Moroni, P.; Bevilacqua, C.; Martin, P. 2014. Contribution of mammary epithelial cells to the immune response during early stages of a bacterial infection to *Staphylococcus aureus*. *Veterinary Research*. 45: 16.
- Burriel, A.R. 1997. Dynamics of intramammary infection in the sheep caused by coagulase-negative staphylococci and its influence on udder tissue and milk composition. *Veterinary Record*. 140: 419–423.
- Caballero-Villalobos, J.; Garzón Sigler, A.; Oliete, B.; Arias, R.; Jiménez, L.; Núñez Sánchez, N.; Martínez Marín, A.L. 2015. Relationship of somatic cell count and composition and coagulation properties of ewe's milk. *Mljekarstvo*. 65: 138-143
- Caria, M.; Chessa, G.; Murgia, L.; Todde, G.; Pazzona, A. 2016. Development and test of a portable device to monitor the health status of Sarda breed sheep by the measurement of the milk electrical conductivity. *Italian Journal of Animal Science*. 15: 275-282.
- Caverio, D.; Tölle, K.H.; Rave, G.; Buxadé, C.; Krieter, J. 2007. Analyzing serial data for mastitis detection by means of local regression. *Livestock Science*. 110: 101–110.
- Chagunda, M.G.G.; Larsen, T.; Bjerring, M.; Ingvarsen, K.L. 2006. L-lactate dehydrogenase and N-acetyl-B-D-glucosaminidase activities in bovine milk as indicators of non-specific mastitis. *Journal of Dairy Research*. 73: 431-440.
- Clements, A.C.A.; Taylor, D.J.; Fitzpatrick, D.J. 2003. Evaluation of diagnostic procedures for subclinical mastitis in meat-producing sheep. *Journal Dairy Research*. 70: 139–148.
- Contreras, A.; Sierra, D.; Corrales, J.C.; Marco, J.C.; Paape, M.J.; Gonzalo, C. 2007. Mastitis in small ruminants. *Small Ruminant Research*. 68:145-153.

- Corrales, J.C.; Contreras, A.; Sánchez, A.; Luengo, C.; Marco, J.C. 1997. Etiología y diagnóstico microbiológico de las mastitis caprinas. *Ovis* 53: 33-66.
- De Cock, B., Nieboer, D., Van Calster, B., Steyerberg, E., Vergouwe, Y. 2023. The Calibration Curves package: validating predicted probabilities against binary events. R package version 1.0.0. Recuperado el 15 de septiembre de 2023 de: <https://github.com/BavoDC/CalibrationCurves>.
- De Mol, R.M.; Keen, A.; Kroeze, G.H.; Acten, J.M.F.H. 1999. Description of a detection model for oestrus and diseases in dairy cattle based on time series analysis combined with a Kalman filter. *Computers and Electronics in Agriculture*. 22: 171–185.
- Diana, L.; Traglia, G.; Diana, V.; Calvino, L.; Laporta, J.; Iriarte, A.; Puentes, R. 2024. Duplex droplet digital PCR detection of streptococcus uberis and streptococcus dysgalactiae, major etiological agents of bovine mastitis. *Frontiers in Animal Science*. 4: 1336816.
- Díaz, J.R.; Romero, G.; Muelas, R.; Alejandro, M.; Peris, C. 2012. Effect of intramammary infection on milk electrical conductivity in Murciano-Granadina goats. *Journal Dairy Science*. 95: 718-726.
- Dohoo, I.R.; Smith, J.; Andersen, S.; Kelton, D.F.; Godden, S. 2011. Diagnosing intramammary infections: Evaluation of definitions based on a single milk sample. *Journal of Dairy Science*. 94: 250–261.
- Dore, S.; Liciardi, M.; Amatiste, S.; Bergagna, S.; Bolzoni, G.; Caligiuri, V.; Cerrone, A.; Farina, G.; Montagna, C.O.; Saletti, M.A.; Scatassa, M.L.; Satgiu, G.; Cannas, E.A. 2016. Survey on small ruminant bacterial mastitis in Italy, 2013–2014. *Small Ruminant Research*. 141: 91–93.
- Eckersall, P.D.; Conner, J.G. 1988. Bovine and canine acute phase proteins. *Veterinary Research Communications*. 12: 169-178.
- Eckersall, P.; Young, F.J.; Macomb, C.; Hogarth, C.J.; Safi, S.; Weber, A.; McDonald, T.; Nolan, A.M.; Fitzpatrick, J.L. 2001. Acute phase proteins in serum and milk from dairy cows with clinical mastitis. *Veterinary Record*. 148: 35-41.
- Emanuelson, U.; Olsson, T.; Holmberg, O.; Hageltorn, M.; Mattila, T.; Nelson, L.; Åström, G. 1987. Comparison of some screening tests for detecting mastitis. *Journal of Dairy Science*. 70: 880–887.

- Ergün, Y.; Aslantaş, Ö.; Doğruer, G.; Kireççi, E.; Saribay, M. K.; Ateş, C.T.; Ülkü, A.; Demir, C. 2009. Prevalence and etiology of subclinical mastitis in Awassi dairy ewes in southern Turkey. *Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences*. 33: 477-483.
- FAO. Food and Agriculture Organization of the United Nations. 2023. <https://www.fao.org/faostat/es/#data/QCL>
- Farkye, N. Y. 2011. *Encyclopedia of Dairy Sciences*, 2nd ed. Vol. 2 (Eds: J. W. Fuquay, P. F. Fox, P. L. H. McSweeney). Elsevier, Amsterdam. pp. 943 – 948.
- Fasulkov, I.; Wehrend, A.; Goericke-Pesch, S. 2014. Ulytrasonographic findings of pathological changes in the mammary gland in Bulgarian native goats. *Small Ruminant Research*. 120: 174–180.
- Fox, L.K.; Hancock, D.D.; McDonald, J.S.; Gaskins, C.T. 1988. N-acetyl- β -D-glucosaminidase activity in whole milk and milk Fractions1. *Journal of Dairy Science*. 71: 2915–2922.
- Fox, L.K.; Shook, G.E.; Schultz, L.H. 1985. Factors related to milk loss in quarters with low somatic cell counts. *Journal Dairy Science*. 68: 2100-7.
- Fox, P.; Kelly, A. 2006. Indigenous enzymes in milk: overview and historical aspects. Part I *International Dairy Journal*. 16: 500-516.
- Fragkou, I.A.; Solomakos, N.; Dagleish, M.P.; Cripps, P.J.; Papaioannou, N.; Boscós, C.M.; Ververidis, H.N.; Bilinis, C.; Orfanou, D.C.; Govaris, A.; Kyriaskis, I.; Fthenakis, G.C. 2008. Effects of experimental Challenger of ewes with *Mannheimia haemolytica* on subsequent milk composition. *Journal of Dairy Research*. 75: 340-346.
- Fragkou, I.A.; Boscós, C.M.; Fthenakis, G.C. 2014. Diagnosis of clinical or subclinical mastitis in ewes. *Small Ruminant Research*. 118: 86–92.
- Fruganti, G.; Ranucci, S.; Tesei, B.; Valente, C. 1985. Safety evaluation of the sheep udders during an entire lactation period. *La Clínica Veterinaria*. 108: 286–296.
- Fthenakis, G.C.; Jones, J.E.T. 1990. The effect of inoculation of coagulase-negative *Staphylococci* into the ovine mamary gland. *Journal of Comparative Pathology*. 102: 211-219.
- Fuertes, J. A.; Gonzalo, C.; Carriedo, J.A.; San Primitivo, F. 1998. Parameters of test day milk yield and milk componenents. *Journal Dairy Science*. 8: 1300-1307.

- Fűtő, P.; Markus, G.; Kiss, A.; Adányi, N. 2012. Development of a catalase-based amperometric biosensor for the determination of increased catalase content in milk samples. *Electroanalysis*. 24: 107–113.
- Gancedo, J.M.A.; Grandes, J.M.F.; Díez, M.F. 2000. Mastitis por *Aspergillus fumigatus* en ganado ovino. *Revista Iberoamericana de Micología*. 17: 13-17.
- Gelasakis, A.I.; Mavrogianni, V.S.; Petridis, I.G.; Vasileiou, N.G.C.; Fthenakis, G.C. 2015. Mastitis in sheep – the last 10 years and the future of research. *Veterinary Microbiology*. 181: 136–146.
- Giadinis, N.D.; Arsenos, G.; Tsakos, P.; Psychas, V.; Dovas, C.I.; Papadopoulos, E.; Karatzias, H.; Fthenakis, G.C. 2012. Milk-drop syndrome of ewes: Investigation of the causes in dairy sheep in greece. *Small Ruminant Research*. 106: 33-35.
- Gonzalo, C.; Carriedo, J.A.; Baro, J.A.; San Primitivo, F. 1994. Factors Influencing variation of test day milk yield, somatic cell count, fat and protein in dairy sheep. *Journal Dairy Science*. 77: 1537-1542.
- Gonzalo, C.; Ariznabarreta, A.; Tardégula, J.A.; San Primitivo, F. 1998. Factores infecciosos de variación del recuento celular de la leche de oveja. *Ovis*. 56: 27-34.
- Gonzalo, C.; Ariznabarrete, A.; Carriedo, J.A.; San Primitivo, F. 2002. Mammary pathogens and their relationship to somatic cell count and milk yield losses in dairy ewes. *Journal Dairy Science*. 85: 1460-1467.
- Gonzalo, C.; Linage, B.; Carriedo, J.A.; De la Fuente, F.; San Primitivo, F. 2006. Evaluation of the Overall Accuracy of the DeLaval Cell Counter for Somatic Cell Counts in Ovine Milk. *Journal of Dairy Science*. 89: 4613-4619.
- Gougoulis, D.A.; Kyriazakis, I.; Papaioannou, N.; Papadopoulos, E.; Taitzoglou, I.A.; Fthenakis, G.C. 2008. Subclinical mastitis changes the patterns of maternal–offspring behaviour in dairy sheep. *The Veterinary Journal*. 176: 378–384.
- Gougoulis, D.A.; Kyriazakis, I.; Fthenakis, G.C. 2010. Diagnostic significance of behavioral changes of sheep: A selected review. *Small Ruminant Research*. 92: 52–56.
- Grimmer, W.L. 1926. *Lehrbuch der Chemie und Physiologie der Milch*. Berlin, Germany: Verlagsbuchhandlung Paul Parey. pp 182–201
- Grönlund, U.; Hultén, C.; Eckersall, P.D.; Hogarth, C.; Persson Walter, K. 2003. Haptoglobin and serum amyloid A in milk and serum during acute and chronic

experimentally induced staphylococcus aureus mastitis. Journal of Dairy Research. 70: 379-386.

- Guliye, A. Y.; Van Creveld, C.; Yagil, R. 2002. Detection of subclinical mastitis in dromedary camels (*Camelus dromedarius*) using somatic cell counts and the N-acetyl-beta-D-glucosaminidase test. Tropical Animal Health and Production. 342: 95-104.
- Hagiwara, S.; Kawai, K.; Anri, A.; Nagahata, H. 2003. Lactoferrin concentrations in milk from normal and subclinical mastitic cows. Journal Veterinary Medical Science. 65: 319-323.
- Hamann, J., Zeconi, A. 1998. Evaluation of the electrical conductivity of milk as a mastitis indicator. Bulletin of the IDF. 334: 5-22.
- Hamed, A. I.; Abou-Zeid, N.A.; Kebary, K. M. K.; Radwan, A. A. 1993. Physical and Chemicals properties of subclinical mastitic sheep's and goat's milk. Egyptian Journal of Dairy Science. 21: 133-149.
- Hamed, H.; El Feki, A.; Gargouri, A. 2008. Total and differential bulk cow milk somatic cell counts and their relation with antioxidant factors. Comptes Rendus Biologies. 331: 144.
- Harmon, R.J.; Eberhart, D.E.; Jasper, E.; Langlois, E.; Wilson, R.A. Microbiological Procedures for the Diagnosis of Bovine Udder Infection; National Mastitis Council. 1990. Arlington. VA. USA. pp. 1–33.
- Harmon, R. 1994. Physiology of Mastitis and Factors Affecting Somatic Cell Counts. Journal Dairy Science. 77: 2103-2112.
- Harrell F. 2022. Regression Modeling Strategies. R package version 6.3-0. Recuperado el 27 de marzo de 2023 de: <https://CRAN.R-project.org/package=rms>.
- HIPRA. 2020. Cost of mastitis in sheep and goats. What is the origin? What about small ruminants. Recuperado el 12 de abril de 2025 de: <https://aboutsmallruminants.com/analytics-costs-mastitis-sheep-goats/>.
- Hirvi, Y.; Griffiths, M. W. 1998. Milk catalase activity as an indicator of thermization treatments used in the manufacture of Cheddar cheese. Journal of Dairy Science. 81: 338–345.
- Holdaway, R.J.; Holmes, C.W. y Steffert, I.J. 1996. A comparison of indirect methods for diagnosis of subclinical intramammary infection in lactating dairy cows. Australian Journal of Dairy Technology. 51: 64-71.

- Hovinen, M., Simojoki, H., Pösö, R., Suolaniemi, J., Kalmus, P., Suojala, L., Pyörälä, S. 2016. N-acetyl-b-D-glucosaminidase activity in cow milk as an indicator of mastitis. *The Journal of Dairy Research*. 83: 219.
- Hussein, H.A.; EL-Khabaz, K.A.S.; Malek, S.S. 2015. Is udder ultrasonography a diagnostic tool for subclinical mastitis in sheep? *Small Ruminant Research*. 129: 121–128.
- Iancu, I.; Igna, V.; Popa, S.A.; Imre, K.; Pascu, C.; Costinar, L.; Degi, J.; Gligor, A.; Iorgoni, V.; Badea, C.; Nichita, I.; Herman, V. 2025. Etiology and antimicrobial resistance of subclinical mastitis pathogens *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus* spp. and *Enterococcus* spp. in sheep milk. *Veterinary Research Communications*. 49: 30
- Ibeagha-Awemu, E.M.; Ibeagha, A.E.; Messier, S.; Zhao, X. 2010. Proteomics, genomics, and pathway analyses of *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* infected milk whey reveal molecular pathways and networks involved in mastitis. *Journal Proteome Research*. 9: 4604–4619
- Jaeggi, J.J.; Govindasamy-Lucey, S.; Berger, Y.M.; Johnson, M.E; McKusick, B.C.; Thomas, D.L.; Wendorff, W.L. 2003. Hard ewe's milk cheese manufactured from milk of three different groups of somatic cell counts. *Journal of Dairy Science*. 86: 3082–3089.
- Jaramillo, D. P. 2007. Aptitud quesera de la leche de oveja Guirra y efecto de la dieta sobre las características tecnológicas de la leche y del madurado del queso. Tesis Doctoral Universidad Autónoma de Barcelona.
- Jensen, N.E.; Knudsen, K. 1991. Interquarter comparison of markers of subclinical mastitis: somatic cell count, electrical conductivity, N-acetyl-B-Glucosaminidase and antitrypsin. *Journal of Dairy Research*. 58: 389-399.
- Kalmus, P; Simojoki, H.; Pyörälä, S.; Taponen, S.; Holopainen, J.; Orro, T. 2013. Milk haptoglobin, milk amyloid A, and N-acetyl-B-D-D-glucosaminidase activity in bovines with naturally occurring clinical mastitis diagnosed with a quantitative PCR test. *Journal of Dairy Science*. 96: 3662–3670.
- Kalogianni, A.I.; Gelasakis, A.I. 2025. The impact of small ruminant lentiviruses infections on milk yield and milk quality traits in intensively reared dairy sheep. *Small Ruminant Research*. 243: 107424.

- Kang, D.H.; Dougherty, R.H.; Clark, S.; Costello, M. 2002. Catalase activity for rapid assessment of high level total mesophilic microbial load in milk. *Journal of Food Science*. 67: 1844-1846.
- Karzis, J.; Donkin, E.F.; Petzer, I.M. 2007. The influence of intramammary antibiotic treatment, presence of bacteria, stage of lactation and parity in dairy goats as measured by the california milk cell test and somatic cell counts. | Onderstepoort *Journal of Veterinary Research*. 74: 160-167.
- Kastle, J. H.; Roberts, A. 1909. The chemistry of milk. In *Milk and its relation to public health*. Washington, DC, USA:Government Printing Office. pp. 313–425.
- Katsoulos, P.D.; Christodoulopoulos, G.; Minas, A.; Karatzia, M.A.; Pourliotis, K.; Kritas, SK. 2010. The role of lactate dehydrogenase, alkaline phosphatase and aspartate aminotransferase in the diagnosis of subclinical intramammary infections in dairy sheep and goats. *Journal Dairy Research*. 77: 107-111.
- Kawai, K.; Hagiwara, S.; Anri, A.; Nagahata, H. 1999. Lactoferrin concentration in milk of bovine clinical mastitis. *Veterinary Research Communications*. 23: 391-398.
- Keane, O.M.; Budd, K.E.; Flynn, J.; McCoy, F. 2013. Increased detection of mastitis pathogens by real-time PCR compared to bacterial culture. *The Veterinary Record*. 173: 268.
- Kelly, A.L.; Leitner, G. and Merin, U. 2011. Milk quality and udder health. Test Methods and Standards. *Encyclopedia of Dairy Sciences*. 2nd Edn. Academic Press. pp. 894-901.
- Kitchen, B. J.; Middleton, G. 1976. Enzymic methods for the estimation of the somatic cell count in bovine milk: II. N-acetyl- β -D-glucosaminidase test for routine estimation of the somatic cell count in milk. *Journal of Dairy Research*. 43: 491–494.
- Kitchen, B.J.; Middleton, G.; Salmon, M. 1978. Bovine milk N-acetyl-B-D-glucosaminidase and its significance in the detection of abnormal udder secretions. *Journal of Dairy Research*. 45: 15-20.
- Kitchen, B.J. 1981. Review of the progress of dairy science. Bovine mastitis, milk compositional changes and related diagnostic tests. *Journal of Dairy Research*. 48: 167-188.

- Kitchen, B. J.; Kwee, W. S.; Middleton, G. y Andrews, R.J. 1984. Relationship between the level of N-acetyl- B-D-glucosaminidase (NAGase) in bovine milk and the presence of mastitis pathogens. *Journal Dairy Research*. 51: 11-16.
- Köhler, S.D.; Kaufmann, O. 2003. Quarter related measurements of milking and milk parameters in an AMS-herd. *Milchwissenschaft. Milk Science International*. 58: 3-6.
- Korhonen, H.; Kaartinen, L. 1995. Changes in the composition of milk induced by mastitis. In: Sandholm, M., Honkanen-Buzolski, T., Kaartinen, L., Pyörälä, S. (Eds.). *The bovine udder and mastitis*. University of Helsinki, Finland, Helsinki, pp. 76–82.
- Koskinen, M.T.; Wellenberg, G.J.; Sampimon, O.C.; Holopainen, J.; Rothkamp, A.; Salmikivi, L.; Van Haeringen, W.A.; Lam, T.J.G.M.; Pyörälä, S. 2010. Field comparison of real-time polymerase chain reaction and bacterial culture for identification of bovine mastitis bacteria. *Journal of Dairy Science*. 93: 5707–5715.
- Kumar, D.N.; Pinker, N.; Shtenberg, G. 2020. Porous silicon Fabry–Pérot interferometer for N-acetyl-β-d-glucosaminidase biomarker monitoring. *American Chemical Society*. 5: 1969.
- Larsen, T.; Røntved, C.M.; Ingvarsen, K.L.; Vels, L.; Bjerring, M. 2010. Enzyme activity and acute phase proteins in milk utilized as indicators of acute clinical E. coli LPS-induced mastitis. *Animal*. 4: 1672–1679.
- Larsen, T.; Aulrich, K. 2012. Optimizing the fluorometric-Glucuronidase assay in ruminant milk for more precise determination. *J. Dairy Res*. 79: 7–15.
- Las Heras, A.; Fernández-Garayzábal, J.F.; Legaz, E.; López, I.; Fernández, E.; Domínguez, L. 2002. Use of SCC in the diagnosis of subclinical mastitis in Assaf dairy ewes. In: *Proceedings of the XXVII Scientific Conference and VI International Conference of the Spanish Society of Ovine and Caprine Technology*, 19-21 September 2002, Valencia, Spain. pp. 663–669.
- Lazaridis, L.J.; Brozos, C.N.; Kiossis, E.A. 2012. Applications of ultrasonography in ruminants (III): udder and genital system of the male – a review. *Journal of the Hellenic Veterinary Medical Society*. 63: 217–226.
- Le Maréchal, C.; Thiéry, R.; Vautor, E.; Le Loir, Y. 2011. Mastitis impact on technological properties of milk and quality of milk products. A review. *Dairy Science and Technology*. 91: 247–282.
- Leitner, G.; Chaffer, M.; Zamir, S.; Mor, T.; Glickman, A.; Windler, M.; Weisblit, L.; Saran, A. 2001. Udder disease etiology, milk somatic cell counts and NAGase

- activity in Israeli Assaf sheep throughout lactation. *Small Ruminant Research*. 39: 107-112.
- Leitner, G.; Chaffer, M.; Caraso, Y.; Ezra, E.; Kababea, D.; Winkler, M.; Glickman, A.; Saran, A. 2003. Udder infection and milk somatic cell count, NAGase activity and milk composition (fat, protein and lactose) in Israeli-Assaf and Awassi sheep. *Small Ruminant Research*. 49: 157–164.
 - Leitner, G.; Chaffer, M.; Shamay, A.; Shapiro, F.; Merin, U.; Ezra, E.; Saran, A.; Silanikove, N. 2004a. Changes in milk composition as affected by subclinical mastitis in sheep. *Journal Dairy Science*. 87: 46-52.
 - Leitner, G.; Merin, U. y Silanikove, N. 2004b. Changes in milk composition as affected by subclinical mastitis in goats. *Journal Dairy Sciences*. 87: 1719-1726.
 - Leitner, G.; Merin, U.; Glickman, A.; Weisblit, L.; Krifucks, O.; Shwimmer, A.; Saran, A. 2004c Factors influencing milk quantity and quality in assaf sheep and goat crossbreds. *South African Journal of Animal Science*. 34: 162–164.
 - Leitner, G.; Merin, U.; Silanikove, N.; Ezra, E.; Chaffer, M.; Gollop, N.; Winkler, M.; Glickman, A.; Saran, A. 2004d. Effect of subclinical intrammary infection on somatic cell counts, NAGase activity and gross composition of goat's milk. 71: 311-315.
 - Leitner, G.; Silanikove, N.; Merin, U. 2008. Estimate of milk and curd yield loss of sheep and goats with intramammary infection and its relation to somatic cell count. *Small Ruminant Research*. 74: 221–225.
 - Leitner, G.; Merin, T.; Silanikove, N. 2011. Effects of glandular bacterial infection and stage of lactation on milk clotting parameters: Comparison among cows, goats and sheep. *International Dairy Journal*. 21: 279-285.
 - Leth, S.; Krook, M.; Hörnster, E.G. 2004. A feasibility study of the use of a SIRE biosensor in the monitoring of H₂O₂ added to milk samples. A possible new technology for early detection of mastitis? *Innovative Food Science and Emerging Technologies*. 5: 515-522.
 - Li, N.; Richoux, R.; Boutinaud, M.; Martin, P.; Gagnaire, V. 2014. Role of somatic cells on dairy processes and products: A review. *Dairy Science and Technology*. 94: 517–538.
 - Lurueña Martínez, M.A. 2010. Efecto de la raza y del recuento de células somáticas sobre la calidad del queso de oveja. Tesis doctoral. Universidad de Salamanca.

- Maasen-Francke, B.; Wiethoff, M.; Suhr, O.; Clemens, C.; Knoll, A. 2004. A method to detect flakes and clots in milk in automatic milking systems. En: Automatic milking: a better understanding. Conference proceedings. Lelystad. The Netherlands. pp: 251.
- Maisi, P.; Junttila, J.; Seppanen, J. 1987. Detection of sub-clinical mastitis in ewes. British Veterinary Journal. 143: 402–408
- Maisi, P. 1990. Milk NAGase, CMT and antitrypsin as indicators of caprine subclinical mastitis infections. Small Ruminants Research. 3: 493-501.
- MAPA, 2023. <https://www.mapa.gob.es/es/estadistica/temas/estadisticas-agrarias/ganaderia/encuestas-ganaderas/default.aspx#ancla4>
- Martí De Olives, A. 2005. Efecto de la mamitis subclínica y células somáticas sobre producción y calidad de leche de oveja de raza manchega. Tesis Doctoral. Universidad Politécnica de Valencia. España.
- Martí De Olives, A.; Le Roux, Y.; Rubert-Alemán, J.; Peris, C.; Molina, M.P. 2011. Short communication: Effect of subclinical mastitis on proteolysis in ovine milk. Journal of Dairy Science. 94: 5369–5374.
- Martí De Olives, A.; Díaz, J.R.; Molina, M.P.; Peris, C. 2013. Quantification of milk yield and composition changes as affected by subclinical mastitis during the current lactation in sheep. Journal of Dairy Science. 96: 7698–7708.
- Martí De Olives, A.; Navarro-Ríos, M.J.; Rubert-Alemán, J.; Fernández, N.; Molina, M.P. 2015. Composition, proteolysis indices and coagulating properties of ewe milk as affected by bulk tank somatic cell count. Journal of Dairy Research. 82: 344-349.
- Martínez Navalón, B. 2000. El Recuento de Células Somáticas en la Leche de Cabra: Factores de variación y efecto sobre la producción y composición de la leche. Tesis Doctoral. Universidad Politécnica de Valencia.
- Martins, R.F.S.; Paim, T.P.; Cardoso, C.A.; Dallago, B.S.L.; de Melo, C.B.; Louvandini, H.; McManus, C. 2013. Mastitis detection in sheep by infrared thermography. Research in Veterinary Science. 94:722–724.
- Mattila, T.; Syvajarvi, J.; Sandholm, M. 1986. Milk antitrypsin, NAGase, plasmin and bacterial replication rate in whey. Effects of lactation stage, parity and daily milk yield. Zentralbl Veterinarmed. 33: 462-470.

- Mavrogenis, A.P.P.; Koumas, A.; Kakoyiannis, C.K.K.; Taliotis, C.H.H. 1995. Use of somatic cell counts for the detection of subclinical mastitis in sheep. *Small Ruminant Research*. 17: 79–84.
- Mavrogianni, V.S.; Menzies, P.I.; Fragkou, I.A.; Fthenakis, G.C. 2011. Principles of mastitis treatment in sheep and goats. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*. 27: 115–120.
- McDougall, S.; Murdough, P.; Pankey, W.; Delaney, C.; Barlow, J.; Scruton, D. 2001. Relationships among somatic cell count, California mastitis test, impedance and bacteriological status of milk in goats and sheep in early lactation. *Small Ruminant Research*. 40: 245-254.
- McDougall, S.; Pankey, W.; Delaney, C.; Barlow, J.; Murdough, P.A.; Scruton, D.; 2002. Prevalence and incidence of subclinical mastitis in goats and dairy ewes in Vermont, USA. *Small Ruminant Research*. 46: 115–121.
- Mellors, A. 1968. β -N-Acetylglucosaminase in bovine milk. *Canadian journal of biochemistry*. 46: 451-455.
- Menzies, P.I.; Ramanoon, S.Z. 2001. Mastitis of sheep and goats. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*. 17: 333-358.
- Merín, U.; Silanikove, N.; Shapiro, F.; Bernstein, S.; Leitner, G. 2004. Changes in milk composition as affected by subclinical mastitis in sheep and goats. Peer-reviewed paper: 8th International Conference on Goats. South African Society for Animal Science. pp. 188-191.
- Michael, C.K.; Lianou, D.T.; Vasileiou, N.G.C.; Mavrogianni, V.S.; Petinaki, E.; Fthenakis, G.C. 2023. Longitudinal Study of Subclinical Mastitis in Sheep in Greece: An Investigation into Incidence Risk, Associations with Milk Quality and Risk Factors of the Infection. *Animals*. 13: 3295.
- Miller, R.H. y Paape, M.J. 1988. Effects of Parity, Bacteriological Status, Stage of Lactation, and Dry Period on N-Acetyl-B-D- Glucosaminidase Activity of Milk and Dry Secretion. *Journal Dairy Science*. 71: 2508-2512.
- Miralles, Y.; Fornés, V.; Roca, A.; Muelas, R.; Díaz, J.R.; Romero, G. 2024. Factors affecting N-acetyl- β -D-glucosaminidase as an indicator for mastitis detection in dairy sheep. *Animal*. 18: 101111.

- Morgan, F. 2000. Influencia de los recuentos de células somáticas sobre las cualidades tecnológicas de la leche de cabra y las características de los quesos. Recuento de células somáticas en pequeños rumiantes II. Caprino. Ovis. 67: 55-60.
- Moroni, P.; Cuccuru, C. 2001. Relationship between mammary gland infection and some milk immune parameters in Sardinian breed ewes. Small Ruminant Research. 41: 1-7.
- Mottram, T.T.; Hart, J.; Pemberton, R.M. 2000. Biosensing techniques for detecting abnormal and contaminated milk. In: Robotic Milking proceedings of the international symposium in Lelystad, The Netherlands, 17-19 August 2000. Eds: Hogeveen, H.; Meijering, A. Wageningen Press, Wageningen. pp 108-113.
- Mottram, T.; Rudnitskaya, A.; Legin, A.; Fitzpatrick, J.L.; Eckersall, P.D. 2007. Evaluation of a novel chemical sensor system to detect clinical mastitis in bovine milk. Biosensors and bioelectronics. 22: 2689-2693.
- Nagahata, H.; Saito, S.; Noda, H. 1987. Changes in N-acetyl-B-D-glucosaminidase y B-glucuronidase activities in milk during bovine mastitis. Canadian Journal of Veterinary Research. 51: 126-134.
- Nagahata, H.; Fuse, M.; Umehara, K.; Gondaira, S.; Higuchi, H.; Hisaeda, K.; Kumano, Y. 2022. Evaluation of the health status of mammary glands and compositional changes in udder-half milk obtained from dairy goats for milk quality management. Animal Science Journal. 93: 13714.
- Nielsen, B.H.; Jacobsen, S.; Andersen, P.H.; Niewold, T.A.; Heegaard, P.M.H. 2004. Acute phase proteína concentrations in serum and milk from healthy cows, cows with clinical mastitis and cows with extramammary inflammatory conditions. Veterinary Record. 154: 361-365.
- Nielsen, N.I.; Larsen, T.; Bjerring, M.; Ingvarsen, K.L. 2005. Quarter Health, milking interval, and sampling time during milking affect the concentration of milk constituents. Journal Dairy Science. 88: 3186-3200.
- Nirala, N.R.; Shtenberg, G.; 2021. N-acetyl-b-D-glucosaminidase biomarker quantification in milk using Ag-porous Si SERS platform for mastitis severity evaluation. Applied Surface Science. 566: 150700.
- Nogai, K.; Krömker, V.; Gyódi, P.; Hamann, J. 1996. Zur fluoreszenzspektroskopischen und photometrischen bestimmung von N-acetyl--d-

glucosaminidase in milch. Proc. 37. Arbeitstagung Des Arbeitsgebietes Lebensmittelhygiene. 299–306.

- Norberg, E.; Hogeveen, H.; Korsgaard, I. R.; Friggens, N.C.; Sloth, K.H. M. N.; Lovendahl, P. 2004. Electrical conductivity of milk: ability to predict mastitis status. *Journal Dairy Science*. 87: 1099-1107.
- Nyman, A.; Persson, K.; Bennedsgaard, T.W.; Larsen, T.; Emanuelson, U. 2014. Associations of udder-health indicators with cow factors and with intramammary infection in dairy cows. *Journal of Dairy Science*. 97: 5459–5473.
- Nyman, A.; Emanuelson, U.; Waller, K.P. 2016. Diagnostic test performance of somatic cell count, lactate dehydrogenase, and N-acetyl- β -d-glucosaminidase for detecting dairy cows with intramammary infection. *Journal of Dairy Science*. 99: 1440–1448.
- Oliszewski, R.; Kairuz de Nunez, M.S.; Elias de Gonzalez, S.N.; Oliver, G. 2002. Assessment of beta-glucuronidase levels in goat's milk as an indicator of mastitis: comparison with other mastitis detection methods. *Journal of Food Protection*. 65: 864–866.
- Paschino, P.; Vacca, G.M.; Dettori, M.L.; Pazzola, M. 2019. An approach for the estimation of somatic cells' effect in sarda sheep milk based on the analysis of milk traits and coagulation properties. *Small Ruminant Research*. 171: 77–81.
- Pemberton, R.M.; Hart, J.P.; Mottram, T.T. 2001. An Assay for the enzyme Nacetyl-b-D-glucosaminidase (NAGase) based on electrochemical detection using screenprinted carbon electrodes (SPCEs). *Analyst*. 126: 1866-1871.
- Perdigon, G.; Medici, M.; Cecilia, M.; Demacias, M.E.N.; Haedo, R.; Oliver, G.; Holgado, A.A.P.D. 1986. Significance of the presence of bovine-milk beta-glucuronidase in mastitis detection. *Journal Dairy Science*. 69: 27–31.
- Peris, C.; Molina, M.P.; Fernandez, N.; Rodriguez, M.; Torres, A. 1989. Variación en el conteo de células somáticas, CMT y conductividad eléctrica en leche de oveja según la fracción tomada en el ordeño. 4th International Symposium on machine milking of small ruminants. Tel-Aviv (Israel). pp: 389-405.
- Persson, Y.; Larsen, T.; Nyman, A. 2014. Variation in udder health indicators at different stages of lactation in goats with no udder infection. *Small Ruminant Research*. 116: 51–56.

- Petzer, I.M.; Donkin, E.F.; Preez, E.D.; Karzis, J.; Van Der Schans, T. J.; Watermeyer, J. C.; Van Reenen, R. 2008. Value of tests for evaluating udder health in dairy goats: Somatic cell counts, california milk cell test and electrical conductivity. *Onderstepoort Journal of Veterinary Research*. 75: 279–287.
- Piccinini, R.; Binda, E.; Belotti, M.; Daprà, V. y Zecconi, A. 2007. Evaluation of milk components during whole lactation in healthy quarters. *Journal of Dairy Research*. 74: 226-232.
- Pilipčincová, I.; Bhide, M.; Dudriková, E.; Trávníček, M. 2010. Genotypic Characterization of Coagulase- negative Staphylococci Isolated from Sheep Milk in Slovakia. *Acta Veterinaria Brno*. 79: 269-275.
- Pinheiro J, Bates D, DebRoy S, Sarkar D, R Core Team. 2021. nlme: Linear and Nonlinear Mixed Effects Models. R package version 3.1-152. Recuperado el 27 de marzo de 2023 de: <https://CRAN.R-project.org/package=nlme>.
- Pirisi, A.; Piredda, G.; Corona, M.; Pes, M.; Pintus, S. y Ledda, A. 2000. Influence of somatic cell count on ewe's milk composition, cheese yield and cheese quality. *Proceeding of the 6th Great Lakes Dairy Sheep Symposium*. Ontario. pp. 47-59.
- Plumed-Ferrer, C.; Uusikylä, K.; Korhonen, J.; Von Wright, A. 2013. Characterization of *Lactococcus lactis* isolates from bovine mastitis. *Veterinary Microbiology*. 167: 592–599.
- Pyörälä, S. and Pyörälä, E. 1997. Accuracy of methods using somatic cell count and milk N-acetyl- β -D-glucosaminidase activity in milk to assess the bacteriological cure of bovine clinical mastitis. *Journal of Dairy Science*. 80: 2820–2825.
- Pyörälä, S. 2003. Indicators of inflammation in the diagnosis of mastitis. *Veterinary Research*. 34: 565-578.
- Pyörälä, S.; Hovinen, M.; Simojoki, H.; Fitzpatrick, J.; Eckersall, P.D.; Orro, T. 2011. Acute phase proteins in milk in naturally acquired bovine mastitis caused by different pathogens. *Veterinary Record*. 168:535.
- Queiroga, M. C. 2017. Prevalence and aetiology of sheep mastitis in Alentejo regions of Portugal. *Small Ruminant Research*. 153: 123-130.
- Radostits, O., C. Gay, K. Hinchcliff, and P. Constable. 2007. *Veterinary Medicine: A Textbook of the Diseases of Cattle, Horses, Sheep, Pigs and Goats*. 10th ed. Saunders Elsevier, Edinburgh, UK. pp 673-731.

- Rainard, P.; Riollet, C. 2006. Innate immunity of the bovine mammary gland. *Veterinary Research*. 37: 369-400.
- Raynal-Ljutovac, K.; Pirisi, A.; De Crémoux, R.; Gonzalo, C. 2007. Somatic cells of goat and sheep milk: Analytical sanitary, productive and technological aspects. *Small Ruminant Research*. 68: 126-144.
- R Core Team. 2021. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. Recuperado el 27 de marzo de 2023 de: <https://www.R-project.org/>.
- Revilla, I.; Rodríguez-Nogales, J.M.; Vivar-Quintana, A.M. 2007. Proteolysis and texture of hard ewe's milk cheese during ripening as affected by somatic cell counts. *Journal of Dairy Research*. 74: 127-136.
- Romero, G.; Sendra, E.; Muelas, R.; Díaz, J.R. 2010. Effect of electrical conductivity of goat's milk on characteristics of fresh cheese. *Milchwissenschaft*. 65: 56-59.
- Romero, G.; Pantoja, J.C.F.; Sendra, E.; Peris, C.; Díaz, J.R. 2012. Analysis of the electrical conductivity in milking fractions as a mean for detecting and characterizing mastitis in goats. *Small Ruminant Research*. 107: 157-163.
- Romero, G.; Reinemann, D.; Alejandro, M.; Díaz, J.R. 2014. Goat mastitis detection using daily records of milk conductivity: comparative results of different algorithms. *Czech Journal of Animal Science*. 59: 428–434.
- Romero, G.; Roca, A.; Alejandro, M.; Muelas, R.; Díaz, J. R. 2017. Relationship of mammary gland health status and other noninfectious factors with electrical conductivity of milk in manchega ewes. *Journal of Dairy Science*. 100: 1555–1567.
- Rovai, M.; Caja, G.; Salama, A.; A. K.; Jubert, A.; Lázaro, B.; Lázaro, M.; Leitner, G. 2014. Identifying the major bacteria causing intramammary infections in individual milk samples of sheep and goats using traditional bacteria culturing and real-time polymerase chain reaction. *Journal of Dairy Science*. 97: 5393–5400.
- Rovai, M.; Rusek, N.; Caja, G.; Saldo, J.; Leitner, G. 2015. Effect of subclinical intramammary infection on milk quality in dairy sheep: I. Fresh-soft cheese produced from milk of uninfected and infected glands and from their blends. *Small Ruminant Research*. 125: 127-136.
- Ruegg, M.; Bosset, J.O.; Pop, E.; Blanc, B. 1980. Die Bedeutung der elektrischen Leitfähigkeit für die Milchanalytik und hygiene. Eine Literaturübersicht von 1954-1979. *Mitt. Geb. Lebensmittelunters. Hyg.* 71: 427-444.

- Rulquin, H. 1997. Regulation of the synthesis and the secretion of milk constituents in ruminants. *Rencontre Recherche Ruminants*. 4: 327–338.
- Ryan, D.P.; Greenwood, P.L.; Nicholls, P.J. 1993. Effect of caprine arthritis-encephalitis virus infection on milk cell count and N-acetyl-beta-glucosaminidase activity in dairy goats. *The Journal of Dairy Research*. 60: 299–306.
- Saad, A.M.; K. Ostensson. 1990. Flow cytofluorometric studies on the alteration of leukocyte populations in blood and milk during endotoxin-induced mastitis in cows. *American Journal of Veterinary Research*. 51: 1603-1607.
- Samanta, S.; Babbar, S.; Chen, B.; Muppudathi, M.; Bhattarai, S.; Harilal, S.; Pikhay, E.; Shehter, I; Elkayam, A; Bashouti, M.Y.; Akabayov, B; Ron, I; Roizin, Y; Shalev, G. 2024. NAGase sensing in 3% milk: FET-based specific and label-free sensing in ultra-small samples of high ionic strength and high concentration of non-specific proteins. *Biosensors and Bioelectronics*. 258: 116368.
- Sánchez, A.; Corrales, J.C.; Sierra, D.; Contreras, A. 1994. Relación entre edad y prevalencia de infecciones intramamarias subclínicas caprinas. XIX Jornadas Científicas de la Sociedad Española de Ovinotecnia y Caprinotecnia. En: Producción ovina y caprina: 177-187.
- Sánchez, A.; Contreras, A.; Corrales, J.C.; Sierra, D.; Marco, J.C. 1996. El recuento de células somáticas como instrumento de control de mamitis subclínicas en la cabra Murciano-Granadina. XXI Jornadas Científicas de la Sociedad Española de Ovinotecnia y Caprinotecnia. Logroño. 205-212.
- Santos, J.E.P.; Cerri, R.L.A.; Ballou, M.A.; Higginbotham, G.E.; Kirk, J.H. 2004. Effect of timing of first clinical mastitis occurrence on lactational and reproductive performance of Holstein dairy cows. *Animal Reproduction Science*. 80: 31.
- Santos, R.A.; Mendonca, C.L.; Alfonso, J.A.B.; Simao, L.C.V. 2007. Aspectos clínicos e características do leite em ovelhas com mastite induzida experimentalmente com *Staphylococcus aureus*. *Pesquisa Veterinária Brasileira*. 27: 6-12.
- Schaeren, W.; Maurer, J. 2006. Prevalence of subclinical udder infections and individual somatic cell counts in three dairy goat herds during a full lactation. *Schweizer Archiv für Tierheilkunde*. 148: 641-648.
- Schulz, M.E.; Sydow, G. 1957. Die Chloridfreie leitfähigkeit von milch und milchprodukten. *Milchwissenschaft*. 12: 174-177.

- Seifu, E.; Donkin, E.F.; Buys, E.M. 2007. Potential of lactoperoxidase to diagnose subclinical mastitis in goats. *Small Ruminant Research*. 69: 154–158.
- Seligsohn, D.; Younan, M.; Larsen, T.; Morrell, J.M.; Chenais, E.; Nyman, A.K. 2021. Detection of subclinical mastitis in camels (*camelus dromedarius*) using somatic cell count, N-acetyl- β -D-glucosaminidase and lactate dehydrogenase activity. *Small Ruminant Research*. 204: 106512.
- Sevi, A.; Taibi, L.; Albenzio, M.; Muscio, A.; Annicchiarico, G. 2000. Effect of parity on milk yield, composition, somatic cell count, renneting parameters and bacteria counts of Comisana ewes. *Small Ruminant Research*. 37: 99-107.
- Shuster, D.E.; Harmon, R.J.; Jackson, J.A.; Hemken, R.W. 1991. Suppression of Milk Production During Endotoxin-Induced Mastitis. *Journal Dairy Science*. 74: 3763-3774.
- Silanikove, N.; Merin, U.; Leitner, G. 2006. Physiological role of indigenous milk enzymes: an overview of an evolving picture. *International Dairy Journal*. 16: 533–545.
- Silanikove, N.; Leitner, G.; Merin, U.; Prosser, C.G. 2010. Recent advances in exploiting goat's milk: Quality, safety and production aspects. *Small Ruminant Research*. 89: 110–124.
- Sladek, Z.; Rysanek, D.; Ryznarova, H.; Faldyna, M. 2005. Neutrophil apoptosis during experimentally induced *Staphylococcus aureus* mastitis. *Veterinary Research*. 36: 629–643.
- Smolenski, G.A.; Wieliczko, R.J.; Pryor, S.M.; Broadhurst, M.K.; Wheeler, T.T.; Haigh, B.J. 2011. The abundance of milk cathelicidin proteins during bovine mastitis. *Veterinary Immunology and Immunopathology*. 143: 125–130.
- Souza, F.N.; Blagitz, M.G.; Penna, C.F.A.; Della Libera, A.M.M.P.; Heinemann, M.B.; Cerqueira, M.M.O.P. 2012. Somatic cell count in small ruminants: Friend or foe?. *Small Ruminant Research*. 107: 65–75.
- Stuhr, T.; Aulrich, K.; Barth, K.; Knappstein, K.; Larsen, T. 2013. Influence of udder infection status on milk enzyme activities and somatic cell count throughout early lactation in goats. *Small Ruminant Research*. 111: 139–146.
- Summer, A.; Formaggioni, P.; Franceschi, P. 2012. Effects of somatic cell count on the gross composition, protein fractions and mineral content of individual ewe's milk. *African Journal of Biotechnology*. 11: 16377-16381.

- Suojala, L.; Simojoki, H.; Mustonen, K.; Kaartinen, L.; Pyörälä, S. 2010. Efficacy of enrofloxacin in the treatment of naturally occurring acute clinical escherichia coli mastitis. *Journal of Dairy Science*. 93: 1960–1969.
- Tangorra, F.M.; Zaninelli, M.; Costa, A.; Agazzi, A.; Savoini, G.. 2010. Milk electrical conductivity and mastitis status in dairy goats: results from a pilot study. *Small Ruminant Research*. 90: 109-113.
- Timms, L.L; Schultz, L.H. 1985. N-acetyl-B-D-glucosaminidase in milk and blood plasma during dry and early postpartum periods. *Journal Dairy Science*. 68: 3367.
- Tinsky, M.; Zoguri, S.; Pebs, E. 1995. Early detection of clinical and subclinical mastitis using an on line electrical conductivity devue on the parlor. *Proceeding of th 3er Internacional Mastitis Seminar*.
- Tsenkova, R.; Atanassova, S.; Morita, H.; Ikuta, K.; Toyoda, K.; Iordanova, I.K.; Hakogi, E. 2006. Near infrared spectra of cow's milk for milk quality evaluation: Disease diagnosis and pathogen identification. *Journal of Near Infrared Spectroscopy*. 14: 363-370.
- Tzanidakis, N.; Brozos, C.; Voutzourakis, N.; Stefanakis, A.; Malama, E.; Zoller, D.; Zdragkas, A.; Hickford, J.; Sotiraki, S.; Kiossis, E. 2021. Effect of abiotic and biotic factors on subclinical mastitis occurrence in low-input dairy sheep production systems. *Small Ruminant Research*. 198: 2-8.
- Van Asseldonk, M.A.P.M.; Huirne, R.B.M.; Dijkhuizen, A.A.; Beulens, A.J.M. 1999. Dynamic programming to determine optimum investments in information technology on dairy farms. *Agriculture Systems*. 62: 17–28.
- Vasileiou, N.G.C.; Cripps, P.J.; Ioannidi, K.S.; Chatzopoulos, D.C.; Gougoulis, D.A.; Sarrou,S.; Orfanou, A.P.; Politis, T.; Calvo Gonzalez-Valerio, S.; Argyros, V.S.; Mavrogianni, V.S.; Petinaki, E.; Fthenakis, G.C. 2018. Extensive countrywide field investigation of subclinical mastitis in sheep in greece. *Journal of Dairy Science*. 101: 7297–7310.
- Vasileiou, N.G.C.; Mavrogianni, V.S.; Petinaki, E.; Fthenakis, G.C. 2019a. Predisposing factors for bacterial mastitis in ewes. *Reproduction in Domestic Animals*. 54: 1424–1431.
- Vasileiou, N.G.C.; Giannakopoulos, A.; Cripps, P.J.; Ioannidi, K.S.; Chatzopoulos, D.C.; Gougoulis, D.A.; Billinis, C.; Mavrogianni, C.; Petinaki, E.; Fthenakis, G.C. 2019b. Study of potential environmental factors predisposing ewes to subclinical

mastitis in greece. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*. 62: 40.

- Vivar-Quintana, A.M.; Beneitez De La Mano, E.; Revilla, I. 2006. Relationship between somatic cell counts and the properties of yoghurt made from ewes' milk. *International Dairy Journal*. 16: 262–267.
- Walker, J.B.M; Rajala-Schultz, P.J.; Walker, W.L.; Mathews, J.L.; Gebreyes, W.A.; DeGraves, F.J. 2011. Variation in daily shedding patterns of *Staphylococcus aureus* in naturally occurring intramammary infections. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*. 23: 1114–1122.
- Watson, D.L.; Buswell, J.F. 1984. Modern aspects of sheep mastitis. *British Veterinary Journal*. 140: 529–534.
- Watson, D.L.; Franklin, N.A.; Davies, H.I.; Kettlewell, P.; Frost, A.J. 1990. Survey of intramammary infections in ewes on the New England Tableland of New South Wales. *Australian Veterinary Journal*. 67: 6-8.
- Welbeck, K.; Leonard, P.; Gilmartin, N.; Byrne, B.; Viguier, C.; Arora, S.; Kennedy, R. 2011. Generation of an anti-NAGase single chain antibody and its application in a biosensor-based assay for the detection of NAGase in milk. *Journal of Immunological Methods*. 364: 14–20.
- Wenz, J.R.M.; Fox, L.K.; Muller, F.J.; Rinaldi, M.; Zeng, R.; Bannerman, D.D. 2010. Factors associated with concentrations of select cytokine and acute phase proteins in dairy cows with naturally occurring clinical mastitis. *Journal of Dairy Science*. 93: 2458–2470.
- Whyte, D.S.; Orchard, R.; Cross, P.; Wilson, A.; Claycomb, R.W.; Mein, G.A. 2004. An on-line somatic cell count sensor. A Better Understanding of Automatic Milking. *International Symposium Lelystad, The Netherlands*.
- Wilson, D.J.; Herer, P.S.; Sears, P.M. 1991. N-Acetyl- β -D-glucosaminidase, etiologic agent, and duration of clinical signs for sequential episodes of chronic clinical mastitis in dairy cows. *Journal of Dairy Science*. 74: 1539-1543.
- Wu, J.Y.; Delwiche, M.J.; Cullor, J.; Smith, W. 2005. Deoxyribonucleic acid sensor for the detection of somatic cells in bovine milk. *Biosystems Engineering*. 90: 143-151.
- Zadoks, R.N.; Tassi, R.; Martin, E.; Holopainen, J.; McCallum, S.; Gibbons, J.; Ballingall, K.T. 2014. Comparison of bacteriological culture and PCR for detection

of bacteria in ovine milk—Sheep are not small cows. *Journal of Dairy Science*. 97: 6326–6333

- Zafalon, L.F.; Filho, A.N.; De Oliveira, J.V.; De Resende, F.D. 2005. Comportamento da condutividade elétrica e do conteúdo de cloretos do leite como métodos auxiliares de diagnóstico na mastite subclínica bovina. *Pesquisa Veterinária Brasileira*. 25: 159-163.
- Zaninelli, M.; Agazzi, A.; Costa, A.; Tangorra, F.M.; Rossi, L.; Saivoni. 2015. Evaluation of the Fourier Frequency Spectrum Peaks of milk electrical conductivity signals as indexes to monitor the dairy goats' health status by on-line sensors. *Sensors*. 15: 20698-20716.
- Zecconi, A.; Piccinini, R.; Giovannini, G.; Casinari, G.; Panzeri, R. 2004. Clinical mastitis detection by on-line measurements of milk yield, electrical conductivity and milking duration in commercial dairy farms. *Milchwissenschaft*. 59: 240-244.
- Zhao, X.; Lacasse, P. 2008. Mammary tissue damage during bovine mastitis: causes and control. *Journal Animal Science*. 86: 57-65.



VII. ANEXO. COPIA SEPARATAS DE LOS ARTÍCULOS

PUBLICACIÓN 1

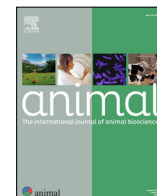
Tipo de artículo	Artículo original
Título	Factors affecting N-acetyl-b-D-glucosaminidase as an indicator for mastitis detection in dairy sheep
Autores	Yolanda Miralles, Victoria Fornés, Amparo Roca, Raquel Muelas, Gema Romero, José Ramón Díaz
DOI	https://doi.org/10.1016/j.animal.2024.101111
Revista	Animal
Editorial	Elsevier
Fecha publicación	15 de febrero de 2024
Categoría JCR	Agriculture, Dairy and Animal Science
Cuartil	Q1
Ranking	4/80
Factor de impacto	4.0

UNIVERSITAS
Miguel Hernández



Animal

The international journal of animal biosciences



Factors affecting N-acetyl- β -D-glucosaminidase as an indicator for mastitis detection in dairy sheep



Y. Miralles^{a,*}, V. Fornés^a, A. Roca^c, R. Muelas^c, J.R. Díaz^b, G. Romero^b

^a Responsible Research Office, Miguel Hernández University (UMH), Avda. de la Universidad s/n 03202 Elche, Spain

^b Agro-food and Agro-environmental Research and Innovation Centre (CIAGRO), Miguel Hernández University (UMH), Ctra. de Beniel km 3.2, 03312 Orihuela, Spain

^c Technical Support Service for Teaching and Research (SATDI), Miguel Hernández University (UMH), Avda. de la Universidad s/n 03202 Elche, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 14 June 2023

Revised 4 February 2024

Accepted 9 February 2024

Available online 15 February 2024

Keywords:

Algorithm

Intramammary infection

Non-infectious factors

Sensitivity

Specificity

ABSTRACT

The study of new indirect methods for mastitis detection is of great relevance both at the economic level of the farm and dairies, and in terms of consumer health, and animal welfare. These methods help us to monitor the disease and speed up the decision-making process on treatment of the affected animal and the destination of the milk. The main aim of this work was to study the effect of intramammary infection and other non-infectious factors on the activity of the enzyme N-acetyl- β -D-glucosaminidase (**NAGase**) in milk, in order to evaluate its use as an indicator for the early diagnosis of mastitis in sheep that could be less expensive, easier to measure and a better marker of inflammation or complementary to existing methods such as somatic cell count (**SCC**). Seven biweekly samplings were carried out, in which NAGase activity, SCC and milk were analyzed. Glands were classified according to their sanitary status based on the results of the SCC and bacteriological analysis. Non-infectious factors such as lactation stage, parity number and milking session had a statistically significant effect on NAGase values, finding the highest NAGase values at the onset and end of the study, in infectious mastitic glands of multiparous females and at morning milking. However, among the NAGase variation factors studied, the health status of the gland was the factor that caused the highest variation in enzyme levels, with infectious mastitic glands showing higher values than healthy glands. The predictive ability of NAGase was also studied by means of several logistic regression models, with the one that included NAGase together with lactation stage and parity obtaining the best results if sensitivity is to be prioritized, or the model that included NAGase, lactation stage, parity, milking and production if specificity is to be prioritized. From the results obtained, it can be concluded that the use of NAGase as an intramammary infection detection method in sheep can be useful when non-infectious factors that cause changes in the concentration of the enzyme are also considered.

© 2024 The Author(s). Published by Elsevier B.V. on behalf of The Animal Consortium. This is an open access article under the CC BY license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Implications

Early detection of mastitis is of great importance to achieve more profitable farms with better sanitary control. The objective of this work was to study whether the enzyme N-acetyl- β -D-glucosaminidase can be a variable of choice for the detection of mastitis in dairy sheep. The results showed that inflammation and intramammary infection caused an increase in N-acetyl- β -D-glucosaminidase, so it could be useful in the early detection of the disease. Other factors such as lactation stage, parity, milking and production affected N-acetyl- β -D-glucosaminidase values to

a lesser extent, so it was also necessary to include them in the algorithm.

Introduction

Mastitis is one of the biggest problems for sheep milk production. It causes serious economic problems as a consequence of the drop in production and cheese yield (Martí de Olives et al., 2013), the premature culling of affected animals, treatment costs, losses of milk not considered fit for consumption, as well as the decrease in the growth of lambs due to the lower production and quality of milk from mastitic ewes (Moroni et al., 2007). They also pose a health risk to the consumer due to the presence of microorganisms and the risk of the presence of antibiotic residues in milk (Bergonier and Berthelot, 2003) and cause an animal welfare prob-

* Corresponding author.

E-mail address: ymiralles@umh.es (Y. Miralles).

lem (Gougoulis et al., 2010). In addition, the decrease in milk production negatively affects the environmental impact, since with more productive animals, we can obtain the same amount of milk with fewer animals and thus pollute the environment less (Capper et al., 2009).

N-acetyl- β -D-glucosaminidase (NAGase) is a lysosomal intracellular enzyme found in milk-producing epithelial cells and leukocytes. Due to the damage to cell membranes and the change in vascular permeability that occurs as a consequence of the inflammatory reaction in the gland during mastitis, NAGase is released into the milk, which is why this type of enzyme increases markedly in the milk during the disease (Kitchen et al., 1978).

A large number of studies in cattle have shown that there is an increase in NAGase activity in milk from infectious mastitic glands compared to healthy glands. Åkerstedt et al. (2011) obtained NAGase levels for healthy glands of between 0.8 and 6.1 U/L, while the mean value for glands with infectious clinical mastitis was 25.0 U/L. Kalmus et al. (2013) and Hovinen et al. (2016) concluded that enzyme activity was related to the severity of clinical signs: the more severe, the higher the NAGase levels. Nyman et al. (2014) in cattle found that intramammary infection status was statistically significantly associated with NAGase values, although it explained only 2% of the variation. It was also observed that parity, milk production, lactation stage, milk urea concentration and time of sampling affected the variable. Therefore, they conclude that it is necessary to study whether the diagnostic properties of NAGase would be improved if these non-infectious factors were taken into account when detecting animals with the disease. Although most published articles have observed a positive correlation between increased activity of this enzyme and intramammary infection (IMI), there are some publications in which no such relationship was found (Piccinini et al., 2007).

Despite the importance of this disease in sheep, there are few studies on this enzyme compared to in cattle. Moroni and Cuccuru (2001) observed differences between NAGase activity in healthy and infected glands. Leitner et al. (2004a) obtained statistically significant differences in NAGase values between healthy and infected glands, with values even varying depending on the pathogen that caused IMI. However, the effect of other variables and physiological factors on activity in sheep remains to be studied.

The aim of this work was to study the effect of IMI and other non-infectious factors, such as lactation stage, parity number and milking session, on NAGase enzyme activity in sheep milk, as well as its relationship with somatic cell count (SCC) and milk production. In addition, taking all these factors into account, the predictive ability of NAGase was studied in order to find the best algorithm to carry out the detection of IMI in a faster and easier way than other disease detection methods currently used, such as bacteriological culture or testing by PCR.

Material and methods

Animal management

This observational study was carried out at the Miguel Hernández University, in the facilities of the Small Ruminants Teaching and Experimental Farm of the Polytechnic School of Orihuela. The study included 82 Manchega ewes, 24 primiparous and 58 multiparous. The production system was intensive, with housing throughout the year in a 100 m² pen (1.19 m²/animal), with access to an open-air area throughout the day. The average temperature at the beginning of the study was 15 °C, progressively increasing to an average of 23 °C at the end of the study. The reproductive rhythm practiced on the farm was one lambing per year, introduc-

ing the males at the beginning of September at a rate of one male for every 10 females and remaining with them for 28 days. Lambing took place in February, and the lambs were weaned and fed artificially. Mothers began to be mechanically milked twice a day (0800 and 1600 h). The milking routine was simple: attachment of the cluster without teat predipping, machine milking and machine stripping, and a postdipping of teats with a bath of iodine solution. The milking parameters used were: Pulsation ratio: 50%, pulsation rate: 180 puls/min, and vacuum level: 36 KPa. The animals were fed throughout the trial daily with 2.5 kg of complete ration (Unifeed) divided into two doses a day and had free access to straw and water. The diet provided to the animals was mainly based on corn, soybean, barley and wheat. The care of the animals used in this study was carried out in accordance with European regulations (Directive 2010/63/EU of the European Parliament and of the Council of animals used for scientific purposes).

Study design

Sampling methodology

During the 3.5 months of the study, a sampling was carried out every 15 days, the first check being two weeks after lambing, for a total of seven samplings. In the morning session, prior to milking, a 5 mL aseptic sample (teat cleaning with ethanol and collection in a sterile tube) was collected for microbiological analysis. Subsequently, each mammary gland was milked in a volumetric meter to record production and take a 100 mL sample of the total milk, which was used for SCC and NAGase enzyme activity analysis (at both milkings). The individual ewe was considered the experimental unit.

Analyses in the laboratory

To perform bacteriological analysis, 20 μ L of milk were seeded on sheep blood-agar plates and incubated at 37 °C. Bacterial colony growth was counted at 24, 48 and 72 h, taking into account growth rate, culture appearance, density and characteristic features of the colonies. Following the recommendations of the methodology proposed by the National Mastitis Council (Harmon et al., 1990), positive cultures were considered those in which the growth of five or more identical colonies per plate was observed. In cases in which the growth of three or more different colonies was observed, the culture was classified as contaminated. These analyses were always carried out by the same person.

The SCC ($\times 1\,000$ cells/mL) was analyzed from azidiol-preserved samples by the fluoro-opto-electronic method (Model Fossomatic 5000, Foss Electric, Hillerød, Denmark) at LICOVAL (Laboratorio Interprofesional Lechero de la Comunidad Valenciana). The laboratory was accredited and complied with the ISO standard 8196-3. The inter-assay agreement was 5%, with analyses whose replications had a CV less than 4% (intra-assay) being accepted as valid. Analysis of NAGase activity (μ M/min per mL) was performed using a fluorescence spectrophotometer (Fluostar Optima, BMG Labtech, Germany) according to the method described by Kitchen et al. (1978). Analyses were always performed by the same person. The inter-assay agreement was 15%, with analyses whose replications had a CV less than 15% (intra-assay) being accepted as valid.

Definition of the health status of the gland

Based on the experience of the research group and the literature reviewed (Las Heras et al., 2002; Burriel, 1997), glands were classified according to their health status based on the following criteria:

glands were considered to have infectious mastitis if the SCC was higher than 400 000 cells/mL and the bacteriological culture was positive in two or more consecutive samplings. Glands in which the SCC remained above the same value, but the bacteriological analysis was negative, were considered to have non-specific mastitis. Glands in which, despite positive bacteriological culture, the SCC remained below 400 000 cells/mL, were classified as latent infection. And finally, if the SCC was lower than 400 000 cells/mL and the bacteriological culture was positive only in an isolated sampling, the glands were considered healthy. In this study, clinical symptoms were not considered to define the presence or absence of the disease, only the presence of microorganisms and the SCC were taken into account.

Description of critical methods

To ensure the reproducibility of the published research, we present in the [Supplementary Materials](#) the codes of the statistical models referred to in the Inferential analysis between NAGase and explanatory variables and in the Predictive models for IMI detection. First, the R code of the mixed linear regression model is presented to complete the understanding of the inferential analysis. Second, the predictive model code is presented in detail along with additional measures that provide information for the classification of mastitis. The full description of the statistical models is explained in the Statistical Methodology section.

Validation of methods used

Validation of the predictive regression models was addressed by internal validation of the Area Under Curve. The internal validation process of the predictive ability was carried out using K-fold cross-validation, where the sample was divided into $K = 10$ folds. The assessment of the calibration performance of the predictive models was carried out. Regarding inter and intra-ewe variability, given the repeated measurements along samplings in each gland, nested random intercepts were considered in the inferential analysis. Therefore, SD measures and residual deviation were reported.

Statistical methodology

The distribution of the variables was evaluated by box plots and histograms. SCC ($\times 1\,000$ cells/mL) and NAGase ($\mu\text{M}/\text{min}$ per mL) values were transformed using the natural logarithm to correct for skewness of their distribution and ensure normality of the data. These transformed variables were used in the regression models, while in the case of descriptive or non-parametric tests, the original scale variable was used to facilitate interpretation. Descriptive analyses were performed using the mean (SD) and median (1st, 3rd quartile), while absolute and relative frequencies were used for qualitative variables.

The correlation between quantitative variables was assessed using the bootstrapping correlation coefficient by means of R library *rmcorr* (Bakdash and Marusich, 2023), given the non-independence of the observations. Confidence intervals were calculated using bootstrapping since it does not require distributional assumptions. The correlation between NAGase and SCC was calculated globally, separated by the two milking times (morning, evening) and taking into account the SCC levels ($< 200\,000$, between $200\,000$ and $400\,000$ and $> 400\,000$ cells/mL) to assess the degree of correlation at each of the times. The relationship between NAGase and production was also studied.

Multiple univariate comparisons were performed using mixed regression models. Subsequently, two-by-two multiple comparisons were performed using Tukey's test and the Bonferroni correction. For the inferential analysis of the factors considered (lactation stage, parity, milking and health status), a mixed linear regression analysis was performed considering that NAGase is a continuous quantitative variable and the correlation between repeated mea-

surements of the same animal (covariance structure). The effects considered in this study were: lactation stage (Sampling: 1, 2, 3, 4, 5, 6 and 7), parity number (primiparous or multiparous), milking session (Milking: morning or evening), gland health status (healthy, infectious mastitis, non-specific mastitis or latent infection) and their first-order interactions. The random effect of gland (right or left) nested to the ewe was indicated in the model to explain the clustering of mammary glands within animals. SD of intra-ewe and inter-ewe was reported. An unstructured covariance structure was used to account for repeated animal measurements. The final model provided the best fit for the data in each variable studied compared to different models that considered other covariances and hierarchical structures (evaluated using the Akaike information criterion).

In order to evaluate the predictive ability of NAGase and the other factors considered (lactation stage, parity, milking and udder production), logistic regression models were carried out to predict IMI. To compare the predictive ability of NAGase with SCC, logistic regression models with SCC have been performed as well. The predictive ability of the models was evaluated using the Area Under Curve (AUC), Nagelkerke's R^2 and the threshold value for which the sensitivity, specificity, precision, positive predictive value and negative predictive value were calculated. To assess the calibration performance of predictive models, plot calibration curves and statistics regarding slope were obtained. Analyses were carried out using the nlme (Pinheiro et al., 2021), rms (Harrell, 2022), Calibration Curves (De Cock et al., 2023) and R statistical software (R Core Team, 2021) libraries. A P -value < 0.05 was considered statistically significant.

Results

Mastitis prevalence

The prevalence of intramammary infection obtained in this study was between 13 and 20%, being between 7 and 9% glands with infectious mastitis and between 6 and 11% glands with latent infection (Table 1). This prevalence remained stable throughout the entire study. Considering gland health status, both the percentage of infectious mastitic glands and the percentage of latently infected glands remained stable in all samplings, between 7–8% and 7–10%, respectively (Table 1). However, in sampling 1, the lowest percentage of healthy glands (55%) and the largest proportion of non-specific mastitis (30%) were observed, while from the second sampling onwards, the percentage of healthy glands rose to around 80% and that of non-specific mastitis decreased to 0 and 3% (Table 1). It was found that practically all the animals with non-specific mastitis in the first sampling showed an increase in SCC bilaterally, values that decreased to normal in the second sampling. Taking into account the parity number, the percentage of infected glands in primiparous ewes was between 0 and 6%, while in multiparous ewes, this percentage was higher (19–23%).

Pathogens isolated during the study

Table 2 shows the NAGase and SCC values according to the pathogen that caused the infection. The most frequently isolated pathogens were *staphylococci* (96.9%), with *S. xylosus* and *S. lentus* being the most frequently found (33.8 and 21.5%, respectively). The highest values were obtained in glands infected by *S. aureus* ($223.7\,\mu\text{M}/\text{min}$ per mL and $13\,881\,000$ cells/mL), followed by those infected by *S. xylosus* with values of $123.9\,\mu\text{M}/\text{min}$ per mL and $466\,500$ cells/mL. The lowest values were found in glands infected with *S. lentus*, being lower than those of healthy glands ($16.6\,\mu\text{M}/$

Table 1
Prevalence in ewes of gland health status throughout the study and overall NAGase values (μM/min per mL).

Sampling (n° of glands)	Healthy	Infectious mastitis	Non-specific mastitis	Latent infection
1 (n = 314)	173 (55%)	28 (9%)	95 (30%)	18 (6%)
2 (n = 322)	260 (81%)	28 (9%)	9 (3%)	24 (7%)
3 (n = 322)	260 (81%)	28 (9%)	9 (3%)	24 (7%)
4 (n = 320)	260 (83%)	24 (8%)	0 (0%)	30 (9%)
5 (n = 316)	250 (81%)	26 (8%)	0 (0%)	34 (11%)
6 (n = 316)	250 (81%)	22 (7%)	12 (4%)	26 (8%)
7 (n = 290)	236 (83%)	24 (9%)	0 (0%)	24 (8%)
NAGase	40.1	152.7 (113)	109.8 (103.4)	49
Mean (SD)	(32.5)	116.1	86	(36.5)
Median	32.4	(74.5, 202.6)	(38.4, 140.3)	42.8
(1st, 3rd Q.)	(19, 51.5)			(4.3, 62.3)

Abbreviations: NAGase = N-acetyl-β-D-glucosaminidase; Q = quartile.

Table 2
N-acetyl-β-D-glucosaminidase and somatic cell count (Median (1st, 3rd Q.) of milk from morning milking of ewes depending on the type of pathogen causing the infection.

Pathogen	NAGase (μM/min per mL)	n	SCC (× 1 000 cells/mL)	n
Healthy glands	34.2 (20.3, 57.8)	847	69 (43, 121.3)	900
<i>Enterobacteriaceae</i>	71.5 (63.6, 80)	4	260 (194, 277.8)	4
<i>Staphylococcus spp.</i>	55.1 (32, 106.4)	28	86 (52, 241)	33
<i>S. aureus</i>	223.7 (167.7, 284.6)	3	13 881 (10 947, 23 192)	6
<i>S. xyloso</i>	123.9 (66.3, 197.2)	41	466.5 (181.5, 2 197.5)	44
<i>S. caprae</i>	59.4 (14.6, 104.5)	11	80 (50, 1 099)	9
<i>S. haemolyticus</i>	45.4 (33.8, 52.2)	3	115 (84.5, 135.5)	3
<i>S. sciuri</i>	45.2 (45.2, 45.2)	1	58 (52.5, 66)	3
<i>S. lentus</i>	16.6 (13.3, 34.6)	24	61.5 (39.5, 92.8)	28

Abbreviations: NAGase = N-acetyl-β-D-glucosaminidase; Q = quartile; SCC = somatic cell count; n = number of glands.

min per mL, 61 500 cells/mL and 34.2 μM/min per mL, 69 000 cells/mL, respectively).

In the [Supplementary Material](#), we can see three figures showing the values of NAGase, SCC and bacteriological culture of the sheep with the most frequent occurrence of *S. aureus* ([Fig. S1](#)), *S. xyloso* ([Fig. S2](#)) and *S. lentus* ([Fig. S3](#)). We can observe the difference in response that the pathogen produced in each of the animals. The SCC values were highest in the glands with *S. aureus* ([Fig. S1](#)), followed by those infected with *S. xyloso* ([Fig. S2](#)) and finally, the values of the glands infected with *S. lentus* ([Fig. S3](#)), in which no differences with the values of the healthy glands were observed. Regarding NAGase, no major differences were seen between the first two animals, but with the animal with *S. lentus*, the values were much lower. With respect to the bacteriology results, we observed that there were no changes in the classification throughout the lactation, all the samples that were positive in the first control remained positive in the last control, as did the negative samples. In general, high SCC levels corresponded with positive bacteriology, but in both [Fig. S1](#) and [Fig. S2](#), we can see that in some controls, there was an increase of SCC above 400 000 cells/mL with negative bacteriology.

N-acetyl-β-D-glucosaminidase variation factors

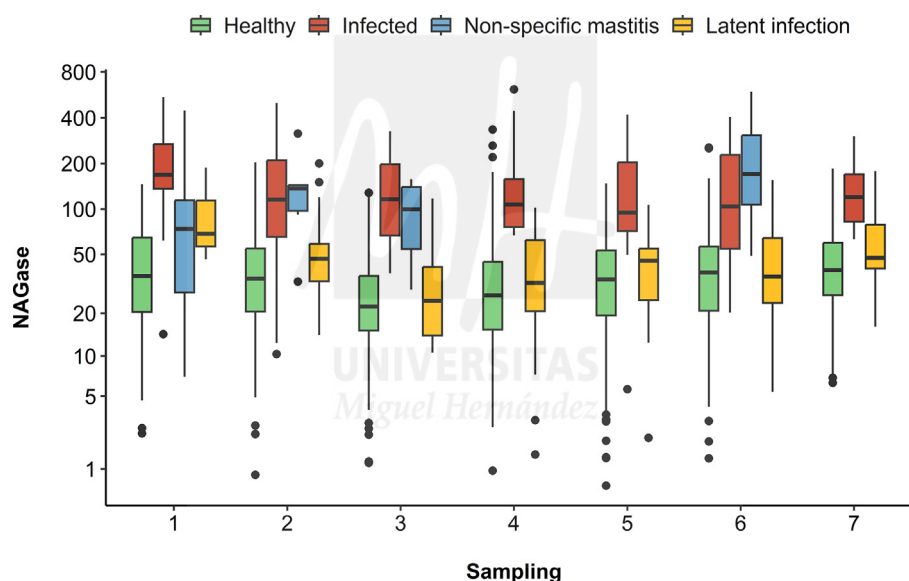
In [Table 3](#), we can see the results of the inferential analysis between NAGase and the non-infectious factors. The mixed regression model code is presented in [Supplementary Material S1](#). The results showed that the effect of lactation stage was statistically significant, with the highest NAGase values observed in the first sampling, decreasing considerably in sampling 3 ($d = -0.36$, $P < 0.001$), and then gradually increasing until reaching a maximum in sampling 7 ($d = 0.18$, $P = 0.011$) ([Fig. 1](#)). Regarding milking, NAGase values were statistically significantly lower in the evening than in the morning ($d = -0.09$, $P = 0.004$) ([Fig. 2](#)). As for parity, a statistically significant interaction with gland health status was

observed, such that, in primiparous females, a statistically significant positive difference was detected ($d = 0.63$, $P = 0.025$) of infectious mastitic (81.39 μM/min per mL) versus healthy (37.32 μM/min per mL) glands, with no statistically significant difference of the latter from latently infected (55.14 μM/min per mL) and non-specific mastitis (52.04 μM/min per mL) glands ($P = 0.575$ and $P = 0.169$, respectively) ([Fig. 2](#)). In contrast, in multiparous ewes, infectious mastitic (128.94 μM/min per mL) and non-specific mastitis (100.04 μM/min per mL) glands had statistically higher log (NAGase) values ($d = 0.67$, $P = 0.026$ and $d = 0.60$, $P < 0.001$, respectively) than healthy ones (29.77 μM/min per mL). The results when comparing healthy glands and those with latent infection (41.89 μM/min per mL) were inconclusive ($P = 0.983$). The between-female variance parameter was 0.24 (95% CI [0.15, 0.38]), and the within-animal variance parameter was 0.003 [5 e-5, 0.12]. Given that the residual variance of the model was 0.54 [0.37, 0.79], this results in an intraclass correlation coefficient of $\rho_{ewe} = 0.309$. Therefore, the proportion of the total variance explained by the grouping structure of female ewes is low, meaning that results are not very dependent on the ewes to which the observations belong.

The Q-Q plot ([Fig. S4](#)) shows that residuals are heavier-tailed compared to the normal distribution, as specified in the [Table 3](#)-footer. The most notable deviation points to low NAGase values. This is explained by the observational nature of the study given that there are much more healthy glands than infectious or non-specific mastitis or latent infections (see [Table 1](#), with percentages of healthy glands around 80% throughout the study). This is representative of what usually happens on farms, and healthy glands have lower values of NAGase. That explains the asymmetrical distribution of NAGase and the deviation observed on the left part of the Q-Q plot. The highest extreme values may be due to the animal being in a state of immunosuppression, which makes it easier for the amount of bacteria inside the animal to be higher than in other animals, causing more cellular damage and higher than usual

Table 3Inferential analysis between N-acetyl- β -D-glucosaminidase and explanatory variables in sheep milk¹.

Outcome: log(NAGase)	Estimate (d)	SE	95% Confidence Interval		P-value
(Intercept)	3.75	0.1	[3.55,	3.94]	< 0.001
Sampling – 2	–0.05	0.07	[–0.18,	0.09]	0.476
Sampling – 3	–0.36	0.07	[–0.49,	–0.23]	< 0.001
Sampling – 4	–0.19	0.07	[–0.32,	–0.05]	0.006
Sampling – 5	–0.06	0.07	[–0.20,	0.07]	0.346
Sampling – 6	0.01	0.07	[–0.12,	0.14]	0.896
Sampling – 7	0.18	0.07	[0.04,	0.33]	0.011
Milking – Evening	–0.09	0.03	[–0.15,	–0.03]	0.004
Parity – Multiparous	–0.34	0.05	[–0.43,	–0.25]	< 0.001
Gland Health Status – Infectious mastitis	0.63	0.28	[0.08,	1.19]	0.025
Gland Health Status – Non-specific mastitis	0.21	0.15	[–0.09,	0.50]	0.169
Gland Health Status – Latent infection	0.20	0.35	[–0.49,	0.89]	0.575
Multiparous: Infectious mastitis	0.67	0.30	[0.08,	1.25]	0.026
Multiparous: Non-specific mastitis	0.60	0.18	[0.25,	0.94]	< 0.001
Multiparous: Latent infection	0.01	0.36	[–0.69,	0.71]	0.983
Var Ewe:Gland(Intercept)	0.003		[5 e–5,	0.12]	
Var ewe(Intercept)	0.24		[0.15,	0.38]	
Residual	0.54		[0.37,	0.79]	

Abbreviations: NAGase = N-acetyl- β -D-glucosaminidase; Var = Variance.¹ Model diagnosis: normality and homoscedasticity of residuals can be found in [Supplementary Fig. S4](#). Q-Q plot shows that residuals have heavier tails than the normal distribution, which could lead to biased estimates. This could be problematic for the prediction of data points, but is not the aim of the study.**Fig. 1.** N-acetyl- β -D-glucosaminidase values (μ M/min per mL) throughout the study according to the health status of the sheep glands. Abbreviations: NAGase = N-acetyl- β -D-glucosaminidase.

NAGase values. The 60% of the samples with low NAGase values considered outliers came from glands with a higher than average milk production, and more than 70% of the samples had SCC values lower than or equal to 100 000 cells/mL, this may indicate that there is a dilution effect that has caused the decrease in the values of both NAGase and SCC. The rest of the values can be considered as outliers typical of a sample with variability.

Univariate comparisons were made of the health status of the glands in each of the conditions ([Table 4](#)). In the seven samplings of the study, statistically significant differences ($P < 0.001$) were found between the NAGase values of infectious mastitic and healthy glands, obtaining the highest estimated difference in the first one. Multiparous females showed greater differences between health states than primiparous females. Differences between pairs of health statuses were higher at the evening milking than in the morning milking.

Correlation between N-acetyl- β -D-glucosaminidase, somatic cell count and production

Overall, NAGase and SCC were positively correlated, although to a weak degree ($r = 0.37$) ([Table 5](#)). The correlation coefficients for each milking session were higher in the afternoon milking, except in the range between 200 000 and 400 000 cells/mL. Depending on the SCC interval, it was observed that the higher the SCC, the higher the correlation coefficient ([Supplementary Fig. S5](#)). In the evening, milking of the global sample was obtained a moderate correlation between the two variables ($r = 0.48$). In [Supplementary Fig. S6](#) is represented SCC and NAGase values along samplings for primiparous and multiparous ewes. This figure shows that when bacteriology is positive, primiparous sheep show higher values of SCC and NAGase. This also happens in multiparous sheep, although in

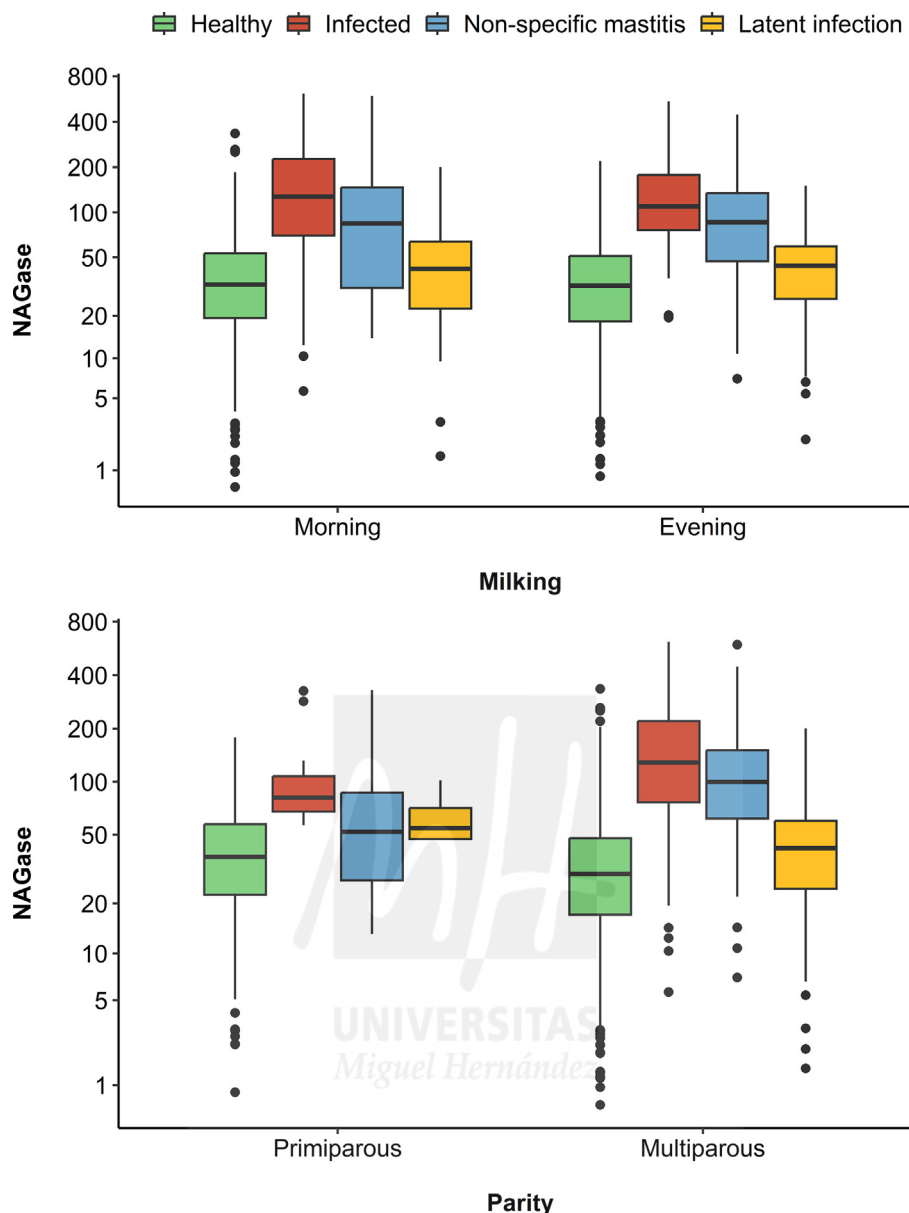


Fig. 2. N-acetyl- β -D-glucosaminidase values ($\mu\text{M}/\text{min}$ per mL) according to parity (lower panel) and milking (upper panel) depending on the health status of the ewe's glands. Abbreviations: NAGase = N-acetyl- β -D-glucosaminidase.

a milder form. Regarding milk production, there was a statistically significant negative association with NAGase (-0.39).

Predictive models

Predictive model code and additional measures for predictive ability assessment are presented in detail in [Supplementary Material S1](#). All predictive models run resulted in an AUC between 0.74 and 0.80 (Table 6). The models with the highest AUC are models 1, 2, 3, 5 and 7. In model 1, NAGase and all study variables (lactation stage, parity, milking and production) were included, in model 2, production was excluded, in 3, milking was excluded and in 5, milking and production were excluded at the same time. Models 2, 3 and 5 obtained predictive ability results similar to model 1, which included all factors, indicating that these factors do not improve the predictive ability of the model. Adding the SCC to model 1 (model 7) also did not improve the predictive ability since the same AUC value was obtained (0.80). Replacing NAGase with

SCC in model 1 (model 6) slightly worsened the predictive ability of the previous models, as a lower AUC value (0.78) was obtained. The predictive model that excludes the variable parity number from model 1 (model 4) reports the lowest AUC, indicating that this variable does provide information for the classification of IML.

Regarding the evaluation of the R^2 index, model 7 is the one that presented the highest value of explained variance (31%), followed by model 6 (27%) and models 1, 2, 3, and 5 (26%). As with the AUC, model 4 is the one that presented the lowest value with 19%. It was corroborated that removing the milking and/or udder production variables from the model hardly reduced the explained variance, since it remained at 26%. However, taking out the variable parity number reduced the explained variance of the R^2 by 7 units (from 26 to 19%) and the addition of SCC increased it by 5 units (from 26 to 31%).

For each of the models, three cut-off values were calculated to classify the samples as infected or healthy. The first threshold is the one that generated the highest sum of sensitivity and speci-

Table 4

Difference and 95% confidence interval in log(NAGase) according to gland health status, throughout the study, parity number and milking session in ewes.

Sampling	Infectious mastitis - Healthy	Non-specific mastitis - healthy	Latent infection - healthy	Infectious mastitis - Non-specific mastitis	Infectious mastitis - Latent infection	Non-specific mastitis - Latent infection
1	1.88*** [1.35, 2.42]	0.60*** [0.22, 0.98]	1.15* [0.10, 2.19]	1.28*** [0.68, 1.89]	0.74 [−0.35, 1.82]	−0.54 [−1.63, 0.55]
2	1.19*** [0.77, 1.61]	0.83* [0.10, 1.57]	0.44* [0.02, 0.86]	0.36 [−0.48, 1.19]	0.75** [0.19, 1.31]	0.39 [−0.45, 1.23]
3	1.62*** [1.21, 2.02]	1.08*** [0.40, 1.76]	0.16 [−0.27, 0.59]	0.53 [−0.21, 1.28]	1.45*** [0.88, 2.02]	0.92* [0.12, 1.71]
4	1.38*** [0.98, 1.78]		−0.12 [−0.46, 0.22]		1.50*** [−1.99, −1.01]	
5	1.09*** [0.57, 1.60]		0.04 [−0.33, 0.40]		1.05*** [0.44, 1.66]	
6	0.90*** [0.30, 1.50]	1.41*** [0.69, 2.12]	−0.20 [−0.66, 0.27]	−0.50 [−1.28, 0.27]	1.10*** [0.38, 1.81]	1.60*** [0.80, 2.40]
7	0.86*** [0.53, 1.19]		0.05 [−0.20, 0.31]		0.81*** [0.41, 1.21]	
Primiparous	0.64* [0.11, 1.17]	0.30* [0.02, 0.58]	0.11 [−0.69, 0.92]	0.34 [−0.26, 0.93]	0.53 [−0.43, 1.49]	0.19 [−0.64, 1.03]
Multiparous	1.25*** [1.02, 1.48]	0.86*** [0.62, 1.10]	0.18* [0.01, 0.36]	0.39*** [0.07, 0.70]	1.07*** [0.79, 1.35]	0.68*** [0.39, 0.97]
Morning	1.04*** [0.76, 1.32]	0.59*** [0.29, 0.88]	0.04 [−0.19, 0.27]	0.45* [0.06, 0.83]	0.99*** [0.64, 1.34]	0.54*** [0.17, 0.91]
Evening	1.31*** [1.03, 1.59]	0.78*** [0.53, 1.03]	0.14 [−0.09, 0.37]	0.53*** [0.17, 0.86]	1.17*** [0.82, 1.52]	0.64*** [0.31, 0.97]

P-values from multiple comparisons were corrected using the Bonferroni method.
Superscript **** means $P < 0.05$.
Superscript ***** indicates that $P < 0.01$.
Superscript ***** indicates that $P < 0.001$.
All other markers did not show statistically significant differences.
Abbreviations: NAGase = N-acetyl- β -D-glucosaminidase.

Table 5

Correlation between N-acetyl- β -D-glucosaminidase and somatic cell count based on to somatic cell values in sheep milk¹.

Bootstrapping Correlation Coefficient r, [95% Confidence Interval]	Milking Morning	Milking Evening	Global
Global SCC	0.29 [0.06, 0.52]	0.48 [0.28, 0.63]	0.37 [0.16, 0.53]
SCC < 200	0.03 [−0.04, 0.10]	0.07 [−0.03, 0.16]	0.01 [−0.04, 0.06]
200 < SCC < 400	−0.43 [−0.91, 0.11]	−0.27 [−0.84, 0.39]	−0.06 [−0.36, 0.23]
SCC > 400	0.03 [−0.46, 0.50]	0.33 [0.14, 0.57]	0.20 [−0.09, 0.49]

Abbreviations: NAGase = N-acetyl- β -D-glucosaminidase; SCC = somatic cell count.
¹ The scatterplot of NAGase and SCC values can be found in [Supplementary Fig. S5](#).

ficity. In the following two, two combinations of sensitivity and specificity were reported, enhancing one of the two in each case. Model 7, which included all variables, presented the highest combined sensitivity (73%) and specificity (71%) for a cut-off value of 0.15, followed with very similar values by models 1, 2, 3 and 5. Model 1, which included NAGase with all variation factors, reported a sensitivity of 64% and a specificity of 79% for a cut-off value of 0.21. Equal values were obtained for model 2, excluding production (cut-off value 0.20, sensitivity 64% and sensitivity 79%). In the models in which milking was excluded (model 3) and production and milking at the same time (model 5), the values were very similar, but with a small increase in sensitivity at the expense of specificity (cut-off values 0.16 and 0.16, sensitivity of 72 and 73% and specificity of 71 and 70%). Model 6, which included the SCC with all variation factors, had a slightly lower combined sensitivity and specificity value than the previous models with

the highest specificity value (96%) and the lowest sensitivity value (45%) for a cut-off value of 0.30. Finally, model 4, which included NAGase with all values except parity, had the lowest overall sensitivity (67%) and specificity (72%) values with a cut-off value of 0.16 (Table 6). Calibration curves were similar in all models (Fig. S7). Given that an internal validation was performed, we focused on the calibration slope which resulted in a value of 1.00 [0.86, 1.14]. This is the target value and given that the calibration curve is over the diagonal the predicted risks correspond well to observed proportions. Nevertheless, there seems to be a systematic pattern, which may be due to the low prevalence of IMI, showing slightly underestimated risks for extreme predicted probabilities. Further studies are needed to improve calibration using external validation procedures.

Discussion

Animal health status

The prevalence of IMI at gland level found in this study (13–20%) was similar to that observed in other previous works such as that of McDougall et al. (2002), who observed a prevalence of 19% at the beginning of lactation or Al-Majali and Jawabreh (2003) who obtained 10%. Considering the influence of lactation stage on prevalence, IMI percentages remained stable in all samplings, which agrees with Leitner et al. (2001), who observed that in 90% of cases, the health status of the glands remained stable throughout lactation. However, McDougall et al. (2002) found that a very high percentage of infected ewes healed spontaneously (93.8%). With regard to the healthy glands and those with non-specific mastitis, in the first sampling, the percentages were 55.1 and 30.3%, while in the second sampling, almost all the non-specific mastitis became healthy with percentages of 81 and 3%, respectively, these values were maintained throughout the study. Almost all the animals that progressed from non-specific mastitis to being healthy, presented in the first sampling an increase in

Table 6

Predictive models for the detection of intramammary infections in ewes.

Regression models	AUC [95% CI]	AUC int. valid	R ²	Threshold Value	Se	Sp	Accuracy	PPV	NPV
1) Mod: log(NAGase) + Lactation stage + parity + milking + Pudder_l	0.80 [0.77, 0.83]	0.80	26%	0.21 0.11 0.27	64% 80% 50%	79% 59% 88%	77% 62% 83%	92% 94% 91%	35% 26% 43%
2) Mod: log(NAGase) + Lactation stage + parity + milking	0.80 [0.77, 0.83]	0.80	26%	0.20 0.11 0.21	64% 80% 62%	79% 59% 80%	77% 62% 77%	92% 94% 92%	35% 26% 35%
3) Mod: log(NAGase) + Lactation stage + parity + Pudder_l	0.80 [0.77, 0.83]	0.80	26%	0.16 0.12 0.21	72% 80% 62%	71% 60% 80%	71% 63% 77%	93% 94% 92%	30% 26% 35%
4) Mod: log(NAGase) + Lactation stage + milking + Pudder_l	0.74 [0.71, 0.78]	0.74	19%	0.16 0.10 0.19	67% 80% 56%	72% 50% 80%	71% 54% 76%	93% 93% 91%	30% 22% 33%
5) Mod: log(NAGase) + Lactation stage + parity	0.80 [0.77, 0.83]	0.80	26%	0.16 0.12 0.21	73% 80% 62%	70% 60% 80%	70% 63% 78%	94% 94% 92%	30% 26% 36%
6) Mod: log(SCC) + Lactation stage + parity + milking + Pudder_l	0.78 [0.75, 0.81]	0.77	27%	0.30 0.11 0.19	45% 80% 57%	96% 54% 80%	88% 58% 76%	96% 94% 91%	44% 23% 34%
7) Mod: log(SCC) + log(NAGase) + Lactation stage + parity + milking + Pudder_l	0.80 [0.77, 0.83]	0.79	31%	0.15 0.11 0.19	73% 80% 60%	71% 59% 81%	71% 62% 77%	93% 94% 92%	31% 26% 35%

Abbreviations: AUC = Area Under Curve; CI = Confidence interval; AUC int. valid = Area Under Curve internally validated using K-fold cross-validation; Se = Sensitivity; Sp = Specificity; PPV = Positive Predictive Value; NPV = Negative Predictive Value; Mod = Model; NAGase = N-acetyl-β-D-glucosaminidase; SCC = somatic cell count; Pudder_l = Production in liters.

SCC bilaterally in both glands, so we suspected that the inflammation of the first control could be due to some physiological reaction of the animal. This could be due to the fact that the first control was performed very close to lambing, and there could still be some physiological inflammatory reaction in the gland due to lambing and the adaptation of mechanical milking, together with a lower milk production that increased the concentration of SCC. The prevalence of mastitis was higher in multiparous (19–23%) than in primiparous females (0–6%), coinciding with the findings of other studies such as that of [Leitner et al. \(2003\)](#) or of [Al-Majali and Jawabreh \(2003\)](#).

Almost all of the isolated pathogens were staphylococci (96.9%), coinciding with [McDougall et al. \(2002\)](#) who found that 100% of subclinical mastitis were caused by staphylococci. *S. aureus* was the bacteria that caused the highest levels of NAGase (223.7 μM/min per mL) and SCC (13 881 000 cells/mL), which is consistent with [Contreras et al. \(2007\)](#), who described that this bacteria could cause severe clinical signs. Enterobacteriaceae also elicited high levels of NAGase and SCC (71.5 μM/min per mL and 260 000 cells/mL), although these were lower than those obtained by *S. xylosum*-infected glands with values of 123.9 μM/min per mL and 466 500 cells/mL. The rest of the coagulase-negative staphylococci elicited lower NAGase and SCC values than those produced by the major pathogens, which is consistent with that described by [Leitner et al. \(2001\)](#).

N-acetyl-β-D-glucosaminidase variation factors

In accordance with other studies, we found that mammary gland health status had a statistically significant effect on NAGase activity. The highest values of the enzyme were found in infectious mastitic glands (116.12 μM/min per mL), followed by those of glands with non-specific mastitis (85.95 μM/min per mL), by those of latently infected glands (42.75 μM/min per mL) and finally those of healthy glands (32.35 μM/min per mL). This is because infectious mastitis, as defined, was accompanied by inflammation and IMI that could increase cell destruction producing high levels of NAGase. The non-specific ones presented lower values, since they

only presented inflammation (high SCC), and in those that presented latent infection, their values were lower than the previous ones because they presented lower SCC levels and a possibly not very severe IMI that did not cause high damage to the lactocytes. Since NAGase is present in both lactocytes and somatic cells, it can be considered both an indicator of inflammation (mastitis, presence of SCC) and of the presence of microorganisms (IMI with or without inflammation). These results are in agreement with those observed for NAGase in cattle by [Kitchen et al. \(1984\)](#), who found statistically significant differences according to whether the gland was considered healthy (negative bacteriology and SCC < 500 000 cells/mL, 18.3 μmol/L per min), with latent infection (positive bacteriology and SCC < 500 000 cell/mL, 20.6 μmol/L per min), with non-specific mastitis (negative bacteriology and SCC > 500 000 cell/mL, 55.8 μmol/L per min) or specific mastitis (positive bacteriology and SCC > 500 000 cell/mL, 62.1 μmol/L per min). In sheep, [Leitner et al. \(2001\)](#) observed statistically significant differences in their values, obtaining in healthy glands values of 0.855 μmol/L per min, in infectious mastitic glands infected with coagulase-negative *staphylococci* 3.37 μmol/L per min and in those infected with streptococci 4.89 μmol/L per min. Later in 2003, [Leitner et al.](#) again found the same effect due to IMI, but with values of 1.145 μmol/L per min in healthy glands and 3.655 μmol/L per min in infectious mastitic glands.

When studying the trend of NAGase values throughout lactation, we saw that the highest values were observed at the beginning and end of the study, and the lowest values were found in the intermediate samplings. This may be due to the increase in polymorphonuclear leukocytes that occurs after lambing and before the dry period ([Fruganti et al., 1985](#)), which could occur as a consequence of physiological and hormonal changes experienced by the ewe at these times that could make the mammary gland more susceptible to infection. It may also be due, as with SCC, to a dilution effect. The SCC evolution curve is inversely related to the milk production curve, [Fuertes et al. \(1998\)](#) observed that the SCC reached its minimum value in the 5th week postpartum, coinciding with the maximum milk production. This trend coincides with that reported in cows by [Hovinen et al. \(2016\)](#),

who observed that NAGase activity was highest during the first 30 days of lactation (1.04 pmol of 4-MU/min per μL milk at 20 °C), decreasing gradually until 100 days postpartum (0.56 pmol of 4-MU/min per μL milk at 20 °C).C), whereafter it tends to increase at the end of lactation in glands with mastitis. In sheep, Moroni and Cuccuru (2001) found that, for milk from both healthy and infected glands, enzyme activity was higher at the end of lactation than at the beginning (20.28 vs 15.62 nmol/mL per min for healthy and 45.30 vs 24.75 nmol/mL per min for infected). These results are different from those of Leitner et al. (2001), who were inconclusive regarding NAGase activity due to lactation stage for any of the 3 health states studied (healthy, coagulase-negative staphylococci-infected and streptococcus-infected glands). Although in all samplings, we observed statistically significant differences between healthy glands and those with infectious mastitis or non-specific mastitis, in the first one, we found the largest differences, making it the time that best discriminates diseased animals from healthy ones.

With respect to the effect of milking, although the highest values of NAGase activity were recorded at the morning milking, the largest differences occurred in the evening milking. In any case, the differences were so small that they are not biologically relevant; therefore, we could indistinctly use either of the two milking sessions to measure the enzyme. This coincides with that observed in sheep by Leitner et al. (2003), whose results were inconclusive regarding NAGase activity according to milking time and by Åkerstedt et al. (2011) in cattle, who observed small differences between milkings.

The last non-infectious factor studied was parity, which showed a statistically significant interaction with health status. Statistically significantly, both primiparous and multiparous females had the highest NAGase values for infectious mastitic glands, although the NAGase values for primiparous females were lower than those for multiparous females. This result is similar to that observed in cattle by Chagunda et al. (2006), who observed that in infected glands, the lowest values were found in primiparous cows. In primiparous females, only the differences between healthy glands and those with infectious mastitis or non-specific mastitis were statistically significant (no statistically significant differences with glands with latent infection); however, in multiparous females, the differences were statistically significant between healthy glands and the rest of the health statuses, and greater than in primiparous females. This could be explained by the fact that multiparous ewes have had a greater exposure to mammary pathogens throughout their lives, so there is a greater reaction of their immune system. These NAGase differences due to parity should be considered in mastitis prediction models in order to optimize their detection capability.

Correlation between N-acetyl- β -D-glucosaminidase, somatic cell count and production

The correlation between the two variables was higher the higher the SCC values were. A moderate positive correlation ($r = 0.48$) was obtained in the evening milking of the global sample, which was significantly higher than in the morning milking of the same sample ($r = 0.29$). This may be due to the fact that the shorter interval between milkings results in a lower production but with a higher concentration of components. The SCC evolution curve is inversely related to the milk production curve, Fuertes et al. curve, Fuertes et al. (1998). This result is similar to those found in other studies in cattle, such as that of Chagunda et al. (2006), in which they found correlations of $r = 0.41$ between the two parameters in healthy glands being higher in glands with mastitis ($r = 0.59$). Other works have obtained higher correlations in glands with subclinical mastitis ($r = 0.73$), but without finding the correlation

between them in healthy glands (Hovinen et al., 2016), which corroborates that an important part of NAGase activity comes from damaged udder epithelial cells and leukocytes (Kitchen et al., 1978). In sheep, Leitner et al. (2001) obtained a correlation coefficient of 0.85 between NAGase and SCC.

Analyzing the relationship between production and NAGase, we observed that there was a negative correlation between NAGase values and milk production. Leitner et al. (2003) observed that milk production of ewes with both healthy glands was higher than with one infectious mastitic gland, compared to infectious mastitis in both glands (2.05, 1.78 and 1.44 kg/day, respectively). These data were corroborated by Leitner et al. (2004b) in another study in which they obtained similar data (2.88, 2.80, and 1.81 kg/day, respectively). Martí de Olives et al. (2013) detected that the decrease in milk production was affected by the severity of IMI, being more pronounced as SCC levels increased.

Predictive models

All models obtained the same predictive ability (AUC 0.80) except model 6 with a similar value (AUC 0.78) and model 4 in which parity number was excluded, where the AUC decreased to 0.74, indicating that this variable provides relevant information when classifying IMI. Models 1, 2, 3, 5 and 7 obtained the best values for sensitivity (64–73%) and specificity (70–79%), although with lower values than those found in other studies in cattle such as Hovinen et al. (2016), who for a cut-off value of 0.76 pmol 4-MU/min per μL milk obtained a sensitivity of 85% and a specificity of 84% to differentiate healthy quarters from those with subclinical mastitis. In sheep, there are no studies on predictive models of NAGase, but Clements et al. (2003) found that the higher the SCC threshold used, the higher the specificity for mastitis detection with the California Mastitis Test increased, while the sensitivity decreased. Berthelot et al. (2006) analyzed SCC in sheep throughout lactation and obtained a specificity of 75%, considering that an udder was healthy if in all samplings, the SCC was lower than 500 000 cells/mL and a sensitivity of 82% if at least two samplings had SCC greater than 1–1.2 million cells/mL.

We must keep in mind that all diagnostic methods have their limitations and there is no 'Gold Standard' test for the detection of inflammation or infection (Adkins and Middleton, 2018). In the case of bacteriology, some of its limitations would be the possibility of contamination of the sample and the subjectivity of the operator who examines it or possible false negatives due to non-continuous excretion. For other methods such as SCC or NAGase, some of these limitations could be that the values of the variables are affected by the pathogen that causes the infection and by external factors such as lactation stage, parity number, milking session, etc. This may cause the limitation of not reaching 100% sensitivity and specificity. As can be seen in Supplementary Figure S3, it is possible that sometimes glands with positive bacteriology (as with SCC), such as those infected with *S.lentus*, do not increase the variable and IMI cases are not detected with this method, but in practice, this would not be a serious problem at an economic and livestock level as these types of IMI are not causing a stronger affection of the gland by the pathogen. Although it has its limitations, we consider that the use of NAGase can be valid for the detection of IMI that causes a greater involvement of the gland.

According to the results obtained, any of the models 1, 2, 3, 5 and 7 could be used, as they are very similar for both AUC, internally validated AUC, and sensitivity and specificity values. Models 1 and 2 have the highest specificity, while model 5, which includes NAGase, lactation stage and parity, includes fewer variables than the others, and has the highest sensitivity and the same AUC as other more complex models. The addition of the SCC to the more complex NAGase model (model 1) made the R^2 slightly higher

because the model was more complex as it included more variables; however, the inclusion of the SCC did not improve the predictive ability of model 1. The criterion of choice will depend on the characteristics of the farms, taking into account the cost of installing electronic production meters and the cost of increasing false positives and the possible costs of treatment or confirmatory analysis. This will depend on the usual average herd prevalence, as higher prevalence may make higher sensitivity desirable. By prioritizing specificity over sensitivity, a lower false positive rate is obtained with a consequent reduction in veterinary costs for unnecessary treatment. When using model 5, the results are similar to those of more complex models, leading to a reduction in analysis costs. This model, being the simplest of all because it includes fewer variables, could be the most suitable algorithm for use at the farm level together with biosensors such as those proposed for cattle by Kumar et al. (2020) or Nirala and Shtenberg (2021) that would help us in the early detection of the disease.

Conclusions

The findings obtained in this study suggest that the NAGase enzyme can be used as an indirect detection method for mastitis in sheep, since, although it is also affected by other non-infectious factors, it is IMI that causes the greatest changes in enzyme levels. We consider that all NAGase models, except model 4, can be good options for IMI detection as they have a predictive ability equal or superior to the SCC model. The choice will depend on the needs of farms depending on whether they need to prioritize specificity or sensitivity.

Supplementary material

Supplementary material to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.animal.2024.101111>.

Ethics approval

The procedures were carried out in accordance with Spanish and European animal protection laws. This project was approved by the Research Ethics Committee of the Miguel Hernández University with the ethical approval code DTA-JDS-001-09, according to the Spanish Royal Decree RD 53/2013 and the EU Directive 2010/63/EU for the protection of animals used for experimental research and other scientific purposes.

Data and model availability statement

None of the data were deposited in an official repository. The original contributions presented in the study are included in the article; further inquiries can be directed to the corresponding author(s).

Declaration of Generative AI and AI-assisted technologies in the writing process

During the preparation of this work the author(s) did not use any AI and AI-assisted technologies.

Author ORCIDs

Y. Miralles: <https://orcid.org/0000-0001-5660-8988>.
V. Fornés: <https://orcid.org/0000-0001-9648-3059>.
A. Roca: <https://orcid.org/0000-0001-7502-9420>.

R. Muelas: <https://orcid.org/0000-0003-0692-4397>.

J.R. Díaz: <https://orcid.org/0000-0002-9885-8624>.

G. Romero: <https://orcid.org/0000-0001-9219-1542>.

Declaration of interest

None.

CRediT authorship contribution statement

Y. Miralles: Writing – review & editing, Writing – original draft, Visualization, Investigation, Conceptualization. **V. Fornés:** Formal analysis, Writing – review & editing, Validation. **A. Roca:** Resources, Investigation. **R. Muelas:** Resources, Investigation. **J.R. Díaz:** Writing – review & editing, Resources, Project administration, Funding acquisition, Conceptualization. **G. Romero:** Writing – review & editing, Supervision, Resources, Conceptualization.

Acknowledgements

The authors would like to thank the farm staff for all the care they provide daily to the animals.

Financial support statement

The study was supported by project AGL200606909 (Ministry of Education and Science, Spain and FEDER).

References

- Adkins, P.R.F., Middleton, J.R., 2018. Methods for Diagnosing Mastitis. *Veterinary Clinics* 34, 479–491.
- Åkerstedt, M., Forsbäck, L., Larsen, T., Svennersten-Sjaunja, K., 2011. Natural variation in biomarkers indicating mastitis in healthy cows. *Journal of Dairy Research* 78, 88–96.
- Al-Majali, A.M., Jawabreh, S., 2003. Period prevalence and etiology of subclinical mastitis in Awassi sheep in southern Jordan. *Small Ruminant Research* 47, 243–248.
- Bakdash, J., Marusich, L., 2023. rmcrr: Repeated Measures Correlation. R package version 0.6.0. Retrieved on 17 on January 2023 from <https://CRAN.R-project.org/package=rmcrr>.
- Bergonier, D., Berthelot, X., 2003. New advances in epizootiology and control of ewe mastitis. *Livestock Production Science* 79, 1–16.
- Berthelot, X., Lagriffoul, G., Concordet, D., Barillet, F., Bergonier, D., 2006. Physiological and pathological thresholds of somatic cell counts in ewe milk. *Small Ruminant Research* 62, 27–31.
- Burriel, A.R., 1997. Dynamics of intramammary infection in the sheep caused by coagulase-negative staphylococci and its influence on udder tissue and milk composition. *Veterinary Record* 140, 419–423.
- Capper, J.L., Cady, R.A., Bauman, D.E., 2009. The environmental impact of dairy production: 1944 compared with 2007. *Journal of Animal Science* 87, 2160–2167.
- Chagunda, M.G., Larsen, T., Bjerring, M., Ingvarsen, K.L., 2006. L-lactate dehydrogenase and N-acetyl-β-D-glucosaminidase activities in bovine milk as indicators of non-specific mastitis. *Journal of Dairy Research* 73, 431–440.
- Clements, A.C., Taylor, D.J., Fitzpatrick, J.L., 2003. Evaluation of diagnostic procedures for subclinical mastitis in meat-producing sheep. *Journal of Dairy Research* 70, 139–148.
- Contreras, A., Sierra, D., Sanchez, A., Corrales, J.C., Marco, J.C., Paae, M.J., Gonzalo, C., 2007. Mastitis in small ruminants. *Small Ruminant Research* 68, 145–153.
- De Cock, B., Nieboer, D., Van Calster, B., Steyerberg, E., Vergouwe, Y., 2023. The Calibration Curves package: validating predicted probabilities against binary events. R package version 1.0.0. Retrieved on 15 September 2023 from <https://github.com/BavoDC/CalibrationCurves>.
- Fruganti, G., Ranucci, S., Tesi, B., Valente, C., 1985. Safety evaluation of the sheep udders during an entire lactation period. *La Clinica Veterinaria* 108, 286–296.
- Fuertes, J.A., Gonzalo, C., Carriedo, J.A., San Primitivo, F., 1998. Parameters of test day milk yield and milk components for dairy ewes. *Journal of Dairy Science* 81, 1300–1307.
- Gougoulis, D.A., Kyriazakis, I., Fthenakis, G.C., 2010. Diagnostic significance of behavioral changes of sheep: A selected review. *Small Ruminant Research* 92, 52–56.
- Harmon, R.J., Eberhart, D.E., Jasper, E., Langlois, E., Wilson, R.A., 1990. Microbiological Procedures for the diagnosis of Bovine Udder Infection. National Mastitis Council, Arlington, VA, USA.

- Harrell F., 2022. Regression Modeling Strategies. R package version 6.3-0. Retrieved on 27 March 2023 from <https://CRAN.R-project.org/package=rms>.
- Hovinen, M., Simojoki, H., Pösö, R., Suolaniemi, J., Kalmus, P., Suojala, L., Pyörälä, S., 2016. N-acetyl- β -D-glucosaminidase activity in cow milk as an indicator of mastitis. *The Journal of Dairy Research* 83, 219.
- International Organization for Standardization (ISO), 2022. Milk: Definition and evaluation of the overall accuracy of alternative methods of milk analysis. Part 3: Protocol for the evaluation and validation of alternative quantitative methods of milk analysis. ISO 8196-3:2022(en). ISO, Geneva, Switzerland.
- Kalmus, P., Simojoki, H., Pyörälä, S., Taponen, S., Holopainen, J., Orro, T., 2013. Milk haptoglobin, milk amyloid A, and N-acetyl-B-D-D-glucosaminidase activity in bovines with naturally occurring clinical mastitis diagnosed with a quantitative PCR test. *Journal of Dairy Science* 96, 3662–3670.
- Kitchen, B.J., Middleton, G., Salmon, M., 1978. Bovine milk N-acetyl- β -D-glucosaminidase and its significance in the detection of abnormal udder secretions. *Journal of Dairy Research* 45, 15–20.
- Kitchen, B.J., Kwee, W.S., Middleton, G., Andrews, R.J., 1984. Relationship between the level of N-acetyl- β -D-glucosaminidase (NAGase) in bovine milk and the presence of mastitis pathogens. *Journal of Dairy Research* 51, 11–16.
- Kumar, D.N., Pinker, N., Shtenberg, G., 2020. Porous silicon fabry-pérot interferometer for N-Acetyl- β -D-glucosaminidase biomarker monitoring. *ACS Sensors* 5, 1969–1976.
- Las Heras, A., Fernández-Garayzábal, J.F., Legaz, E., López, I., Fernández, E., Domínguez, L., 2002. Use of SCC in the diagnosis of subclinical mastitis in Assaf dairy ewes. In: *Proceedings of the XXVII Scientific Conference and VI International Conference of the Spanish Society of Ovine and Caprine Technology*, 19–21 September 2002, Valencia, Spain, pp. 663–669.
- Leitner, G., Chaffer, M., Zamir, S., Mor, T., Glickman, A., Winkler, M., Weisblit, L., Saran, A., 2001. Udder disease etiology, milk somatic cell counts and NAGase activity in Israeli Assaf sheep throughout lactation. *Small Ruminant Research* 39, 107–112.
- Leitner, G., Chaffer, M., Caraso, Y., Ezra, E., Kababea, D., Winkler, M., Glickman, A., Saran, A., 2003. Udder infection and milk somatic cell count, NAGase activity and milk composition (fat, protein and lactose) in israeli-assaf and awassi sheep. *Small Ruminant Research* 49, 157–164.
- Leitner, G., Chaffer, M., Shamay, A., Shapiro, F., Merin, U., Ezra, E., Silanikove, N., Shapiro, F., Merin, U., Ezra, E., Saran, A., Silanikove, N., 2004a. Changes in milk composition as affected by subclinical mastitis in sheep. *Journal of Dairy Science* 87, 46–52.
- Leitner, G., Merin, U., Glickman, A., Weisblit, L., Krifucks, O., Shwimmer, A., Saran, A., 2004b. Factors influencing milk quantity and quality in assaf sheep and goat crossbreds. *South African Journal of Animal Science* 34, 162–164.
- Martí De Olives, A., Díaz, J.R., Molina, M.P., Peris, C., 2013. Quantification of milk yield and composition changes as affected by subclinical mastitis during the current lactation in sheep. *Journal of Dairy Science* 96, 7698–7708.
- McDougall, S., Pankey, W., Delaney, C., Barlow, J., Murdough, P.A., Scruton, D., 2002. Prevalence and incidence of subclinical mastitis in goats and dairy ewes in vermont, USA. *Small Ruminant Research* 46, 115–121.
- Moroni, P., Cuccuru, C., 2001. Relationship between mammary gland infections and some milk immune parameters in Sardinian breed ewes. *Small Ruminant Research* 41, 1–7.
- Moroni, P., Pisoni, G., Varisco, G., Boettcher, P., 2007. Effect of intramammary infection in Bergamasca meat sheep on milk parameters and lamb growth. *Journal of Dairy Research* 74, 340–344.
- Nirala, N.R., Shtenberg, G., 2021. N-acetyl- β -D-glucosaminidase biomarker quantification in milk using Ag-porous Si SERS platform for mastitis severity evaluation. *Applied Surface Science* 566, 150700.
- Nyman, A., Persson, K., Bennedsgaard, T.W., Larsen, T., Emanuelson, U., 2014. Associations of udder-health indicators with cow factors and with intramammary infection in dairy cows. *Journal of Dairy Science* 97, 5459–5473.
- Piccinini, R., Binda, E., Belotti, M., Daprà, V., Zecconi, A., 2007. Evaluation of milk components during whole lactation in healthy quarters. *Journal of Dairy Research* 74, 226–232.
- Pinheiro J, Bates D, DebRoy S, Sarkar D, R Core Team (2021). nlme: Linear and Nonlinear Mixed Effects Models. R package version 3.1-152. Retrieved on 27 March 2023 from <https://CRAN.R-project.org/package=nlme>.
- R Core Team, 2021. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. Retrieved on 27 March 2023 from <https://www.R-project.org/>.



PUBLICACIÓN 2

Tipo de artículo	Artículo original
Título	N-Acetyl- β -D-Glucosaminidase Analysis in Sheep Milk Can Detect Early Intramammary Infection with High Yields If Incorporated into Mathematical Algorithms
Autores	Yolanda Miralles, Victoria Fornés, Amparo Roca, Raquel Muelas, Gema Romero, José Ramón Díaz
DOI	https://doi.org/10.3390/ani15030371
Revista	Animals
Editorial	MDPI
Fecha publicación	28 de enero de 2025
Categoría JCR	Agriculture, Dairy and Animal Science
Cuartil	Q1
Ranking	10/80
Factor de impacto	2.7

UNIVERSITAS
Miguel Hernández

Article

N-Acetyl- β -D-Glucosaminidase Analysis in Sheep Milk Can Detect Early Intramammary Infection with High Yields If Incorporated into Mathematical Algorithms

Yolanda Miralles ^{1,*} , Victoria Fornés ¹ , Amparo Roca ² , Raquel Muelas ², José Ramón Díaz ³ and Gema Romero ³ 

¹ Responsible Research Office, Miguel Hernández University (UMH), Avda. de la Universidad s/n, 03202 Elche, Spain; vfornes@umh.es

² Technical Support Service for Teaching and Research (SATDI), Miguel Hernández University (UMH), Avda. de la Universidad s/n, 03202 Elche, Spain; aroca@umh.es (A.R.); raquel.muelas@umh.es (R.M.)

³ Agro-Food and Agro-Environmental Research and Innovation Centre (CIAGRO), Miguel Hernández University (UMH), Ctra. de Beniel km 3.2, 03312 Orihuela, Spain; jr.diaz@umh.es (J.R.D.); gemaromero@umh.es (G.R.)

* Correspondence: ymiralles@umh.es

Simple Summary: Mastitis is a major concern for dairy producers and society due to its economic and health implications, which is why it is necessary to develop methods for detecting the disease in its early stages. The aim of this study was to study the effect of the establishment of intramammary infection on the values of the enzyme N-acetyl- β -D-glucosaminidase, and to analyse whether, through the use of algorithms, this enzyme could be useful to solve this problem. On the one hand, it was detected that in the 4 days following infection, there was a very sharp increase in the values of this enzyme as a consequence of the infection. On the other hand, it was found that several of the algorithms studied highlighted the good predictive capacity of the enzyme since they allowed up to 89.8% of the observations to be correctly classified, ensuring a sensitivity of up to 95.2% and a specificity of up to 85.7%. Using this algorithm in farm-level biosensors, it would be possible to detect intramammary infections in the first 4 days of the disease, which could significantly reduce the costs associated with this pathology.

Abstract: The aim of this study was to analyse the effect of intramammary infection (IMI) on N-acetyl- β -D-glucosaminidase (NAGase) enzyme values and to study its predictive capacity using different algorithms. To do this, 26 sheep free of intramammary infection were selected, and their somatic cell count (SCC), NAGase and bacteriological culture were monitored for 2 weeks. They were then subjected to a series of unhealthy situations (UHS) for the mammary gland, and these variables were monitored for a further 4 weeks. IMI was established in 12 of the 26 sheep. In the 4 days following infection, a very marked increase in enzyme values was observed in the infected glands. The algorithm that obtained the best result was the one that detected, in at least two of the first four days after infection, an increase in NAGase values greater than 30% compared to the average of the 3 days prior to infection, obtaining an area under the curve (AUC) of 0.90, an accuracy of 89.8%, a sensitivity of 95.2% and a specificity of 85.7%.

Keywords: NAGase; SCC; algorithm; sensitivity; specificity; AUC; accuracy



Academic Editor: Ilektra A. Fragkou

Received: 31 December 2024

Revised: 22 January 2025

Accepted: 25 January 2025

Published: 28 January 2025

Citation: Miralles, Y.; Fornés, V.; Roca, A.; Muelas, R.; Díaz, J.R.; Romero, G. N-Acetyl- β -D-Glucosaminidase Analysis in Sheep Milk Can Detect Early Intramammary Infection with High Yields If Incorporated into Mathematical Algorithms. *Animals* **2025**, *15*, 371. <https://doi.org/10.3390/ani15030371>

Copyright: © 2025 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

Mastitis is a major problem affecting dairy sheep production. From an economic perspective, it can cause significant losses, as the disease causes a decrease in both the quantity and quality of milk, which also results in a decrease in cheese yield [1]. In addition, the cost associated with treating the disease and the possible need to replace the affected sheep increases the operating costs of the farm. In health terms, intramammary infections (IMI) represent a major problem due to the possibility of pathogenic bacteria or their toxins present in milk reaching humans through the consumption of contaminated dairy products [2]. Animal welfare is also compromised when cases of mastitis appear since the pain associated with inflammation of the mammary gland can cause stress and suffering in affected sheep, affecting their quality of life and their ability to engage in normal behaviours, such as feeding and resting [3]. Finally, mastitis also negatively affects the environment, since due to the decrease in milk production, there is lower efficiency in the use of natural resources and greater pollution of the environment by needing more animals to obtain the same output [4]. For all the reasons mentioned above, early diagnosis of mastitis in sheep is essential to reduce its negative impacts.

N-acetyl- β -D-glucosaminidase (NAGase) is an enzyme found mainly in the lysosomes of leukocytes and, to a lesser extent, in the epithelial cells of the mammary gland. This enzyme is released into milk as a consequence of cellular damage and the inflammatory response that occurs during mastitis; therefore, it could be considered a good indicator of the disease [5]. Other studies in cattle have also managed to discriminate between healthy glands and those with both subclinical and clinical mastitis [6,7]. It was also observed that NAGase values were higher in clinical mastitis than in subclinical mastitis [8]. In small ruminants, although to a lesser extent than in cattle, studies have also found that both NAGase and somatic cell count (SCC) values are higher in glands with mastitis [9,10].

NAGase levels are influenced by the type of pathogen causing mastitis, with higher values being found in glands infected by major pathogens [8]. In sheep, a difference was also observed in enzyme values depending on whether the glands were infected with streptococci or coagulase-negative Staphylococcus [11].

The aim of this study was to analyse the effect of the onset of intramammary infection in dairy sheep on the activity of the NAGase enzyme in milk, and to analyse different algorithms that include this enzyme, together with other variables, to determine which one could be the best for IMI detection.

2. Materials and Methods

2.1. Animal Management

This experiment was carried out in the small ruminant facilities of the Teaching and Experimental Farm of the Polytechnic School of Orihuela at Miguel Hernández University. This study included 26 Manchega sheep. The rearing system was intensive, and the animals were housed throughout the year in a 100 m² corral (1.19 m²/animal) with access to an outdoor area during the day. At the start of the experiment, the average temperature was 24 °C, which increased to 27 °C on an average at the end of the experiment. The animals were fed daily throughout the trial with 2.5 kg of dry matter of complete ration (Unifeed), distributed in two doses per day, and had free access to straw and water. The diet was mainly composed of alfalfa hay, corn, soybean, barley and wheat. The reproductive rhythm followed was one birth per year; males were introduced in November with a ratio of one male to every 10 females. Birth took place in April, and the lambs were suckled until one month of age when they were weaned. During this month, the mothers were milked once a day to extract milk that was not consumed by the lambs. After this time, the glands were mechanically milked separately twice a day (8:00 a.m. and 4:00 p.m.) using a milking

machine manufactured by the company Gea Farm Technologies (Bönen, Alemania). The milking parameters used were a pulsation rate of 180 beats/min, a pulsation ratio of 50%, and a vacuum level of 36 KPa. These parameters are adequate for the Manchega breed used, having been used in previous studies carried out by the team [12,13].

The care of the animals used in this study and the procedures performed were carried out in accordance with Spanish Royal Decree RD 53/2013 and EU Directive 2010/63/EU on the protection of animals used for experimental research and other scientific purposes.

2.2. Experimental Design

2.2.1. Sampling Methodology

The total duration of the experiment was 7 weeks, divided into two phases. The first period, called pre-experimental, started after weaning the lambs, lasted 1 week, and aimed to select healthy animals from the 50 lactating ewes available on the farm. The second period, called the experimental period, lasted 6 weeks and was divided into 2 stages. The first, lasting two weeks, aimed to determine the pre-conditions of the animals before the onset of infection. After these two weeks, the animals were subjected to a series of unhealthy situations (UHS) for the mammary gland that favoured the entry of pathogens through the teats at milking time in order to achieve controlled cases of IMI. Once these manipulations had been carried out, the second stage began, which lasted 4 weeks, to analyse the variations that occurred in the variables studied caused by the establishment of the infection. The unfavourable situations for mammary gland health that were practiced were as follows:

- Milking one healthy ewe after another with IMI after reducing the diameter of the short milk tubes (in this way, the volume of evacuation is reduced) and plugging the holes in the teat cups, which allows the introduction of an airflow that helps evacuate the milk (in this way, the immersion of the teat in the milk and the transmission of the infection are favoured) while causing cross-fluctuations allowing sudden air inflow through a teat cup (Figure 1)
- Raising the milking vacuum level to 40 kPa.
- Over-milking for 3 min.
- Not bathing the teats with iodine after milking.



Figure 1. Photo of unhealthy situations.

During the pre-experimental period, 2 samplings were carried out at an interval of 7 days in which the bacteriology, SCC and NAGase were analysed in the morning milking. After studying the results obtained, 26 IMI-free sheep were selected to participate in the experimental period. Three days after the last sampling in the pre-experimental phase, the experimental period began. During the first stage of this phase, sampling was carried

out on days 14, 7 and 3 before the UHS, in which, as in the previous period, bacteriology, SCC and NAGase were analysed in the morning milking. From day 3 before the UHS until the day on which the manipulations were carried out, sampling was performed daily for these variables. In the second stage of the experimental period, after subjecting the animals to UHS for the mammary gland, daily bacteriological cultures were carried out until the presence of infection was confirmed and 6 more samples were collected on days 4, 7, 11, 14, 21 and 28 to check if the gland was still infected. SCC was also analysed daily for the next 14 days after UHS and on days 18, 21 and 28 after the establishment of infection. NAGase was also examined daily on the 4th day after UHS and on days 7, 14, 21 and 28 thereafter. A schematic of the chronology of experimental procedures is shown in Figure 2.

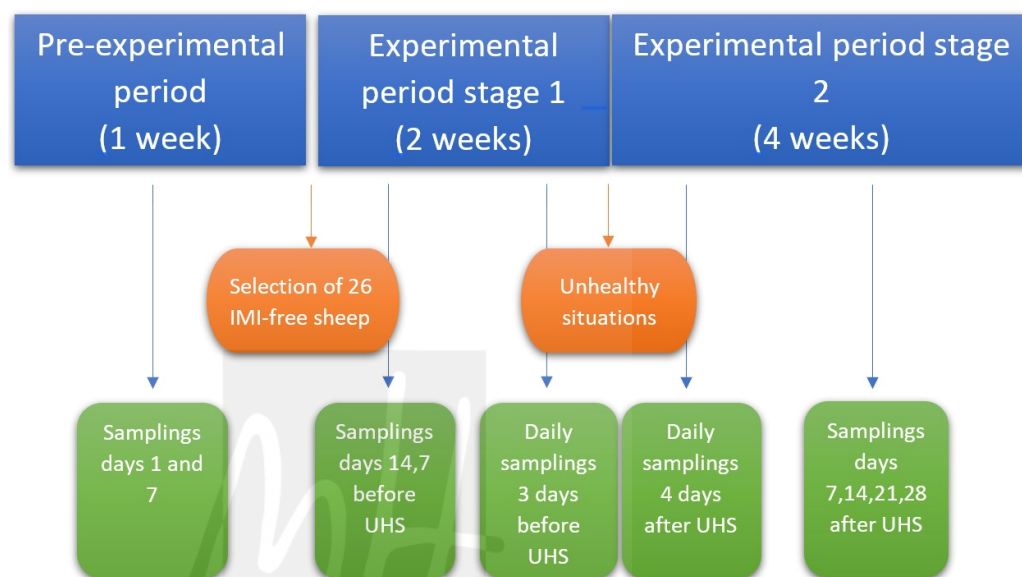


Figure 2. Timeline of experimental procedures. Abbreviations: IMI: Intramammary infection; UHS: unhealthy situation.

The sampling methodology was as follows: before milking in the morning session, after cleaning the teats with ethanol, a 5 mL aseptic sample was collected in a sterile tube for microbiological analysis. Each mammary gland was then milked separately. From this total milk sample, a 100 mL sample was extracted to analyse the enzymatic activity of NAGase and SCC.

2.2.2. Variables Analysed

For bacteriological analysis, sheep blood agar plates were used, in which 20 µL of milk was sown and incubated at 37 °C. After 24, 48 and 72 h, the growth of the bacterial colonies was observed by analysing the density, growth rate, colony traits and appearance of the culture. Following the methodological guidelines proposed by the National Mastitis Council [14], cultures with five or more identical colonies per plate were considered positive. Cultures in which the growth of three or more different colonies was observed were classified as contaminated. In the samples that were positive, the microorganisms were isolated and frozen in milk with 2% glycerol at −4 °C. Identification of the bacterial genus was carried out at the end of the experiment, and Gram staining was performed. For Gram-positive colonies, the catalase test was performed. For staphylococci, the Apistah kit (BioMerieux, Marcy-l'Étoile, France) was used to identify the bacterial species, while for enterobacteria, the BBL Enterotube II kit (BD Diagnostic Systems, Heidelberg, Germany) was used. All the analyses were carried out by the same person.

SCC (1000 cells/mL) was analysed using the fluoro-opto-electronic method (Model Fossomatic 5000, Foss Electric, Hillerød, Denmark) from samples preserved in azidiol. These analyses were carried out at LICOVAL (Laboratorio Interprofesional Lechero de la Comunidad Valenciana). An interassay agreement of 5% was obtained, with analyses presenting a coefficient of variation of less than 4% (intra-assay) considered valid.

NAGase activity ($\mu\text{M}/\text{min}$ per mL) was analysed following the method described by [15] using a fluorescence spectrophotometer (Fluostar Optima, BMG Labtech, Ortenberg, Germany). These analyses were also performed by the same operator. An interassay agreement of 15% was obtained, and these analyses were considered valid if the replicates had an intra-assay coefficient of variation of less than 15%.

2.2.3. Definition of Gland Health Status

To classify the glands according to their health status, bacteriological analysis was used. Positive samples were considered infected, and negative samples were considered healthy. Clinical symptoms were not taken into account when defining the health status of the gland.

2.3. Statistical Analyses

Quantitative variable distributions were assessed using histograms and box plots. SCC ($\times 1000$ cells/mL) and NAGase ($\mu\text{M}/\text{min}$ per mL) values were transformed using the natural logarithm to correct for the skewness of their distribution and ensure normality of the data when they were used in the regression models. However, in the case of descriptive statistics or non-parametric tests, the original scale variable was used to facilitate interpretation. Descriptive analyses were performed using the median (1st and 3rd quartile), while absolute and relative frequencies were used as qualitative variables.

The correlation between quantitative variables was assessed using the bootstrapping correlation coefficient in the R library *rncorr* [16], given the non-independence of the observations. Confidence intervals were calculated using bootstrapping since they do not require distributional assumptions. The correlation between NAGase and SCC was calculated globally, considering the SCC levels ($\leq 400,000$ and $> 400,000$ cells/mL), as well as for each of the time periods.

Univariate comparisons were made between GHS at different time points. *p*-values were adjusted using Holm correction for multiple comparisons. For inferential analysis, a mixed linear regression analysis was carried out considering log-transformed NAGase as a dependent variable. The following variables were considered in this study: days before or after infection (previous 14–7 days, previous 3 days, following 4 days, following 7–14 days, and following 21–28 days), the log-transformed SCC variable, and gland health status (GHS, with four levels. 0: Both collateral glands free of infection throughout the experiment. 1: Free of infection throughout the experiment whose collateral was infected during the experiment. 2: Infected during the experiment whose collateral remained free of infection. 3: Both collateral glands infected during the experiment.) and the first-order interaction between gland health status and time period with respect to the time of onset of infection was included. The random effect of glands (right or left) nested in the ewe was considered in the model to explain the clustering of mammary glands within the animals. An “autoregressive process of order 1” type correlation adjustment was used to model the variance structure between repeated measures from the same animal and gland. The final model provided the best fit for the data compared to other models that considered other covariances and hierarchical structures (evaluated using the Akaike information criterion).

To assess the predictive ability of NAGase values, logistic regression models were performed to predict IMI. The predictive ability of the models was evaluated using the

Area Under Curve (AUC), the sensitivity, specificity, accuracy, positive predictive value and negative predictive value. Given that the onset of infection is expected to cause an increase in NAGase values, NAGase samples of each gland were classified as positive each day (from day 1 to 4 of follow-up after being exposed to UHS) according to different approaches that were proposed:

- Rule 1 (R1): The gland was classified as positive for each day when NAGase was higher than the reference mean value of the three previous days to the UHS by 5, 10, 20%, or 30% as follows:

$$\frac{NAGase_{\{D1, D2, D3, D4\}}}{RefMeanValue_{3d \text{ previous UHS}}} > 1.05; 1.10; 1.20; 1.30$$

- Rule 2 (R2): The gland was classified as positive for each day when NAGase deviated from the reference mean value of the three previous days to the UHS by more than 2 or 3 times the standard deviation of the three previous days to UHS ($SD_{3d \text{ previous UHS}}$), as follows:

$$NAGase_{\{D1, D2, D3, D4\}} - RefMeanValue_{3d \text{ previous UHS}} > 2 \text{ or } 3 SD_{3d \text{ previous UHS}}$$

After classifying NAGase samples as positive or negative in each of the first four days of follow-up after being exposed to UHS according to these two approaches, three different strategies were considered:

- Strategy Any: Each gland was classified as positive when at least one of the four first days of follow-up overcame the corresponding threshold in each rule (R1 and R2); otherwise, the gland was considered negative.
- Strategy Some2: Each gland was classified as positive when at least two of the four first days of follow-up exceeded the corresponding threshold in each rule; otherwise, the gland was deemed negative.
- Strategy Some3: Each gland was classified as positive when at least three of the first four days of follow-up exceeded the corresponding threshold in each rule; otherwise, the gland was classified as negative.

These three strategies were proposed to assess the stability and consistency of NAGase values, as well as the proposed rules over four days of follow-up after the onset of infection. Analyses were carried out using nlme [17], rms [18], Calibration Curves [19], and R statistical software 4.4.0 [20]. A p -value < 0.05 was considered statistically significant.

3. Results

3.1. Mastitis Incidence

In the pre-experimental phase, 26 sheep free of intramammary infection were selected. Of these animals, 12 were infected after UHS, nine bilaterally and three unilaterally, with a total of 21 infected glands (Table 1). Therefore, an incidence of 42.3% at the gland level and 46.2% at the sheep level was obtained. Starting with healthy animals, the incidence throughout the experiment coincided with the prevalence after UHS. Regarding the pathogens causing the disease, the highest percentages of IMI were caused by enterobacteria (71.4%), including *Serratia marcescens* (9.5%), *Klebsiella pneumoniae* (19%), *Pantoea agglomerans* (9.5%) and others (33.4%). Some 28.6% of the infections were caused by staphylococci, with *S. xylosus* found in 9.5% of the glands, *S. caprae* in 4.8%, and 14.3% in other species.

Table 1. Gland health status of ewes in the pre-experimental and experimental phase.

	Gland Health Status (GHS)	Ewes	Glands
Pre-experimental phase	Healthy	23 + 3 glands ¹	49
	Unilateral infection	0	0
	Bilateral infection	0	0
Experimental phase (after subjecting glands to UHS)	Healthy	14	28
	Unilateral infection	3	3
	Bilateral infection	9	18
	Total infected	12	21

¹ Sheep that had only one functional gland. UHS: unhealthy situation.

3.2. Effect of the Onset of Intramammary Infection on the Study Variables

Table 2 shows the effect that the onset of intramammary infection has on NAGase and SCC values. Regarding NAGase, in healthy glands (GHS = 0), a tendency towards a progressive increase in enzyme values over time was observed, and the same occurred in healthy glands whose collateral was infected (GHS = 1), although less markedly. The lowest values in each of the four groups according to the health status of the gland were observed on all days prior to performing the unhealthy situations for the mammary gland (27.44–61.46 $\mu\text{M}/\text{min per mL}$). In the SCC, the lowest values were also found on all previous days in each of the groups (44–97 cell/mL), except in the infected glands that presented the healthy collateral (GHS = 2), in which higher values were observed in the three previous days (367 cell/mL) than in the following 7–14 and 21–28 days (154.5 and 107.5 cell/mL). In both the glands infected with the healthy collateral and those infected bilaterally (GHS = 3), the increase in the values of NAGase and SCC occurred in a very marked manner in the 4 days following the onset of infection, at 95.59 $\mu\text{M}/\text{min per mL}$ and 1,674,000 cells/mL for GHS = 2 and 105.69 $\mu\text{M}/\text{min per mL}$ and 2,601,000 cells/mL for GHS = 3. These values decreased for both variables in the following two samplings, obtaining values in the following 7–14 days of 76.49 $\mu\text{M}/\text{min per mL}$ and 154,500 cells/mL for GHS = 2 and 54.47 $\mu\text{M}/\text{min per mL}$ and 85,500 cells/mL for GHS = 3. In the following 21–28 days, the values obtained were 64.84 $\mu\text{M}/\text{min per mL}$ and 107,500 cells/mL for GHS = 2 and 59.85 $\mu\text{M}/\text{min per mL}$ and 79,000 cells/mL for GHS = 3. These results are represented graphically for NAGase in Figure 3.

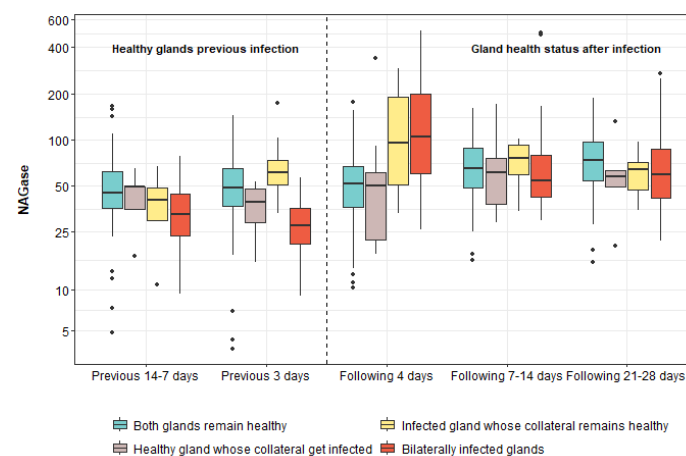


Figure 3. N-acetyl- β -D-glucosaminidase values ($\mu\text{M}/\text{min per mL}$) throughout the study, according to the health status of the sheep glands. Abbreviations: NAGase: N-acetyl- β -D-glucosaminidase. The black dots in the figure represent outliers in the data distribution.

Table 2. Evolution of N-acetyl- β -D-glucosaminidase ($\mu\text{M}/\text{min}$ per mL) and somatic cell count ($\times 1000$ cell/mL) (median (1st, 3rd quartiles)) according to gland health status and period relative to the onset of infection.

NAGase					
Days Prior to UHS			Days After UHS		
GHS	Previous 14–7 d	Previous 3 d	Following 4 d	Following 7–14 d	Following 21–28 d
0-Healthy	45.55 (35.99, 62.14)	49.16 (36.86, 65.55)	51.57 (36.34, 67.31)	65.93 (48.56, 88.82)	74.06 (54.78, 97.06)
1-Healthy collnf	49.82 (35.39, 49.88)	39.13 (28.85, 48.36)	50.36 (22.12, 61.72)	61.35 (39.35, 76.42)	58.29 (49.83, 63.53)
2-Inf colhealthy	40.54 (29.79, 48.84)	61.46 (51.35, 73.88)	95.59 (51.09, 191.15)	76.49 (60.52, 93.51)	64.84 (47.91, 71.61)
3-InfBil	32.88 (23.4, 44.63)	27.44 (20.55, 35.86)	105.69 (60.19, 198.68)	54.47 (42.33, 79.74)	59.85 (41.71, 86.96)

SCC ($\times 10^3$ cell/mL)					
Days prior to UHS			Days after UHS		
GHS	Previous 14–7 d	Previous 3 d	Following 4 d	Following 7–14 d	Following 21–28 d
0-Healthy	54 (44.25, 77.5)	75 (56, 108)	115 (79, 187)	100 (67.5, 128.5)	90 (58.75, 121)
1-Healthy collnf	87 (75, 172)	97 (67, 120)	159.5 (82.75, 259)	101 (88.25, 242.75)	120 (87, 195)
2-Inf colhealthy	76 (66, 804)	367 (97, 1412)	1674 (147.5, 7107)	154.5 (128.5, 335.75)	107.5 (87, 131)
3-InfBil	45 (30.25, 63.75)	44 (37, 62)	2601 (697, 7624)	85.5 (68, 306.75)	79 (51.5, 457.25)

GHS: Glandular health status. 0-Healthy: Both collateral glands free of infection throughout the experiment. 1-Healthy collnf: Free of infection throughout the experiment whose collateral was infected during the experiment. 2-Inf colHealthy: Infected during the experiment, whose collateral remained free of infection. 3-InfBil: Both collateral glands infected during the experiment.

Multiple comparison analysis revealed significant differences in NAGase values three days prior to UHS between glands that developed bilateral infection and both healthy glands ($p < 0.001$) and infected glands whose collateral was healthy ($p < 0.001$). These differences were attributed to the lower values observed in bilaterally infected glands. On the other hand, four days after UHS, significantly higher NAGase levels were observed in unilaterally infected glands whose collateral was healthy compared to bilateral healthy glands ($p = 0.019$). Statistically significant differences were also detected between bilaterally infected glands and both healthy glands ($p < 0.001$) and healthy glands whose collateral was infected ($p = 0.001$), with bilaterally infected glands showing higher values. No statistically significant differences were observed between the other pairs of gland health states at different time points.

According to the mixed linear regression model that evaluated the effect of the co-variables SCC, GHS and Time period (TP) on NAGase, a statistically significant positive relationship (0.28 CI95% [$0.26, 0.31$], $p < 0.001$) was observed with the log_SCC variable. A statistically significant interaction ($p = 0.003$) was also found between the variables GHS and TP; therefore, the establishment of IMI caused a greater increase in NAGase than in infection-free glands, as already observed in Table 2.

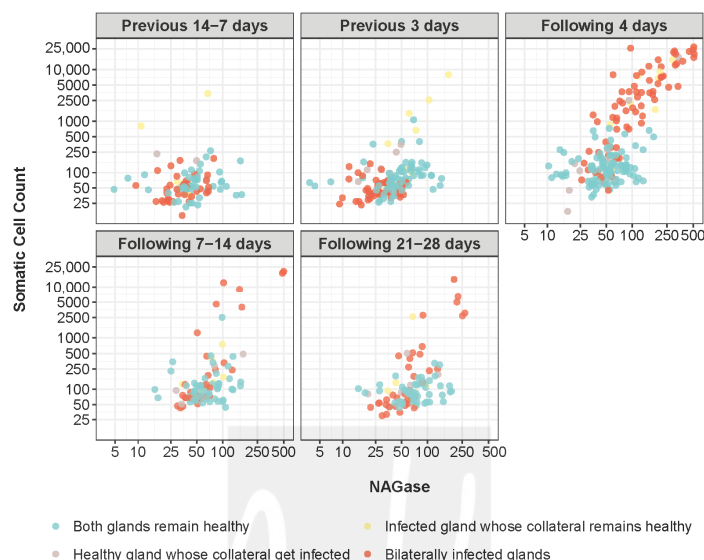
3.3. Correlation Between NAGase and SCC

Table 3 shows the correlation (r) between NAGase and SCC both globally and as a function of the SCC value. Analysing this with the total SCC values, a high positive correlation was found ($r = 0.79$), which decreased when analysed separately as a function of the SCC interval, obtaining higher values when the SCC was higher than 400,000 cells/mL ($r = 0.65$) than when it was lower than or equal to the SCC value ($r = 0.41$). Figure 4 shows the correlation coefficient between the two variables overall throughout the different periods related to the establishment of IMI. Although the correlation was positive in all cases, the highest values were found at 4 and 7–14 days after infection ($r = 0.76$ and $r = 0.61$). The lowest values were obtained 14–7 days prior and 21–28 days after infection ($r = 0.31$ and $r = 0.33$), followed by 3 days prior to infection ($r = 0.55$).

Table 3. Correlation between N-acetyl- β -D-glucosaminidase and SCC based on somatic cell values in sheep milk.

Bootstrapping Correlation Coefficient r , [95% Confidence Interval]	R	n
SCC $\leq$ 400 ($\times 1000$ cell/mL)	0.41 *** [0.34, 0.50]	506
SCC $>$ 400 ($\times 1000$ cell/mL)	0.65 *** [0.56, 0.79]	102
Total	0.79 *** [0.76, 0.82]	608

Abbreviations: r : Correlation coefficient; n : Number of observations used; SCC = somatic cell count. *** $p < 0.001$.

**Figure 4.** Correlation (r) between N-acetyl- β -D-glucosaminidase values ($\mu\text{M}/\text{min}$ per mL) and Somatic Cell Count ($\times 1000$ cell/mL) in ewes' glands according to health status and time period relative to the onset of infection.

3.4. Predictive Models for Mastitis Detection

Table 4 shows all the predictive capacity indicators of the 18 proposed models (6 rules $\times$ 3 strategies), the area under the curve (which measures the predictive capacity of the model between 0 and 1), and accuracy (which is the percentage of observations correctly classified by the model):

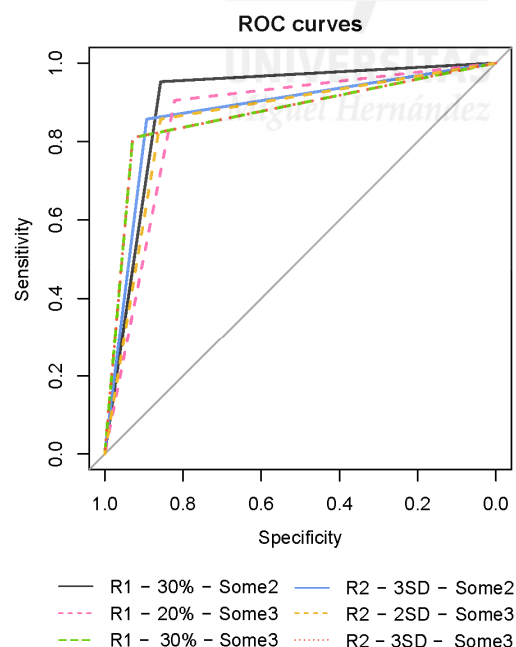
- Strategy Any: The best indicators were offered by the Rule 1–30% model with an AUC of 0.79, which correctly classified 75.5% of the observations and ensured a sensitivity of 100%, but only a specificity of 57%.
- Some2 strategy: Higher AUC and Accuracy values were obtained, especially in the cases of Rule 1–20%, Rule 1–30%, Rule 2-2SD and Rule 2-3SD. Of these four models, there were two that stood out: Rule 1–30%, with an AUC of 0.90, which correctly classified 89.8% of the observations, ensuring a sensitivity of 95.2% and a specificity of 85.7%, and Rule 2-3SD, with an AUC of 0.86, which correctly classified 87.8% of the observations, ensuring a sensitivity of 85.7% and a specificity of 89.3%.
- Some3 strategy: Except for the Rule 1–5%, all the others offered good results. Rule 1–10% with an AUC of 0.85, correctly classified 83.7% of the observations, ensuring a sensitivity of 95.2% and a specificity of 75%; Rule 1–20% correctly classified 85.7% of the observations (AUC of 0.86), ensuring a sensitivity of 90.5% and a specificity of 82.1%; Rule 1–30%, with an AUC of 0.87, correctly classified 87.8% of the observations, ensuring a sensitivity of 81% and a specificity of 92.9%; Rule 2-2SD, with an AUC of 0.86, correctly classified 85.7% of the observations, ensuring a sensitivity of 85.7% and a specificity of 85.7%; and finally, Rule 2-3SD, with an AUC of 0.87, correctly classified 87.8% of the observations, ensuring a sensitivity of 81% and a specificity of 92.9%.

Table 4. Results for predictive models (AUC, Accuracy, Se, Sp, PPV and NPV) using both rules described in the Methodology section when applying algorithms to the NAGase measurements.

		RULE 1				RULE 2	
		5%	10%	20%	30%	2SD	3SD
Strategy Any	AUC	0.50	0.50	0.625	0.79	0.65	0.72
	Accuracy (%)	42.8	42.8	57.1	75.5	61.2	69.4
	Se (%)	100	100	100	100	95.2	90.5
	Sp (%)	0	0	25	57.1	35.7	53.6
	PPV (%)	42.8	42.8	50	63.6	52.6	59.4
	NPV (%)	-	-	100	100	90.9	88.02
Strategy Some2	AUC	0.60	0.67	0.80	0.90	0.79	0.86
	Accuracy (%)	55.1	63.3	77.6	89.8	77.6	87.8
	Se (%)	95.2	95.2	95.2	95.2	90.5	85.7
	Sp (%)	25	39.3	64.3	85.7	67.9	89.3
	PPV (%)	48.8	54.1	66.7	83.3	67.9	85.7
	NPV (%)	87.5	91.7	94.7	96	90.5	89.3
Strategy Some3	AUC	0.74	0.85	0.86	0.87	0.86	0.87
	Accuracy (%)	71.4	83.7	85.7	87.8	85.7	87.8
	Se (%)	95.2	95.2	90.5	81	85.7	81
	Sp (%)	53.4	75	82.1	92.9	85.7	92.9
	PPV (%)	60.6	74.1	79.2	89.5	81.8	89.5
	NPV (%)	93.8	95.5	92	86.7	88.9	86.7

Abbreviations: AUC = Area Under Curve; Se = Sensitivity; Sp = Specificity; PPV = Positive Predictive Value; NPV = Negative Predictive Value; Strategy Any: At least one of the first four days of follow-up overcomes the threshold; Strategy Some2: At least two of the first four days of follow-up overcome the threshold; Strategy Some3: At least three of the four first days of follow-up overcome the threshold.

Figure 5 shows the ROC curves of the proposed algorithms for detecting mastitis. It can be seen that they are very similar, although in some cases, sensitivity is more important and in others, specificity.

**Figure 5.** ROC curves of the best predictive models selected for detecting mastitis.

4. Discussion

The incidence observed in this experiment (42.3% at gland level or 46.2% at sheep level) and the subsequent prevalence are higher than the average generally described in the literature, although these values may vary depending on the source consulted. We can

find studies in which the infection occurred naturally, with very low values of 4.6% [21], average values of 19.3% [22], values closer to those obtained in this work of 39.9% [11], and even higher values (53%) [23]. The high prevalence in this study may be due to the fact that the infection was induced by unfavourable situations that were applied to the mammary gland, which increased the likelihood of the glands becoming infected. In studies carried out in goats with a similar experimental design, in which UHS was also carried out, an incidence of 50% for goats and 33.3% for glands was reported [24].

In this experiment, 71.4% of the glands were infected by enterobacteria and 28.6% were infected by staphylococci. Normally in the literature, in studies in which the infection occurred naturally, we find that enterobacteria infections occur in a very low percentage 3.4% [25], 3.8% [26], 0.9% [27] and that staphylococci are the bacteria that produce a higher percentage of IML, 69.8% [25], 53.4% [26], 76.6% [27]. This difference may be due to the fact that it was not a natural infection, but rather that by causing unfavourable conditions in the mammary glands, the entry of bacteria that were in the environment surrounding the sheep (bedding, soil, manure) was facilitated, which could come into contact with the skin of the gland and subsequently colonise the interior.

Regarding the effect of the onset of intramammary infection on NAGase, it can be seen that, both in healthy glands (GHS = 0) and in healthy glands whose collateral was infected (GHS = 1), a tendency towards a progressive increase in the enzyme values was observed as the lactation stage progressed, as the first control was carried out a few days before 6 weeks after delivery and the last at 12 weeks. This trend corroborates a previous study by our research group in which it was observed that from week 6 after delivery, NAGase tended to rise physiologically until week 14 [28]. In the glands infected with the healthy collateral (GHS = 2) and in those infected bilaterally (GHS = 3), it was observed that, at 4 days after infection, there was a very sharp increase in NAGase values. This may have been due to the fact that, as a consequence of the acute inflammatory response caused by the infection, there was an increase in the release of the enzyme by leukocytes and damaged epithelial cells [5]. These results coincide with those of multiple studies in which it has been proven that infection increases NAGase values in both cows [5], goats [29] and sheep [30]. The values of the unilaterally infected glands increased by 50% compared to the previous 3 days, and almost four times more in those infected bilaterally. This suggests that bilateral infections can cause a more intense inflammatory response, possibly due to a stronger systemic response. Although the values decreased in the following two samplings, they continued to remain above the levels obtained in the previous days in the bilaterally infected glands. This sudden increase post-infection and stabilisation in later periods could have been due to two reasons. On the one hand, it is likely that the microbial load was low, and on the other hand, the animals were in a high immune state and were able to fight the infection quickly. These results coincide with those reported in another study, in which a prevalence of subclinical mastitis of 19% was observed at the onset of lactation, which decreased to 9.1% after 40 days, indicating that 93.8% of the sheep were cured spontaneously [31], and with [32,33] who observed a reduction in the prevalence with the progress of lactation.

The high positive correlation between SCC and NAGase when the values were analysed globally ($r = 0.79$) was very similar to that obtained in other studies, both in sheep ($r = 0.85$) [11] and cattle ($r = 0.73$) [5]. If we analyse the values separately based on the number of somatic cells, the correlation decreases, reaching the highest value when the SCC is higher than 400,000 cells/mL ($r = 0.65$). Although the correlation was positive throughout the study, the highest values were obtained at 4 and 7–14 days after infection ($r = 0.76$ and $r = 0.61$), which coincides with the moments at which the SCC reached the highest values.

Regarding the predictive value of the algorithms that included NAGase to detect intramammary infection, the results showed that, for this calculation, it was preferable to take only 4 days post-infection since these were the days when there was a more pronounced increase in the enzyme values. These values decreased in the following samples; therefore, if we took a wider range of time, the average would drop and the model would be less sensitive. When analysing the results of the predictive models, it was observed that Rule 1–5% generally did not work well, presenting a low specificity, since the NAGase values are quite dispersed and it is easy for them to deviate by more than 5% without the presence of IMI, so classifying as infected glands that present variations greater than only 5% compared to the baseline mean would lead to false positives. The best results were obtained for the Some2 strategy (R1-30% and R2-3SD) and the Some3 strategy (all except R1-5%), with AUC values greater than 0.85. To choose the best classification method, it should be considered whether a higher sensitivity or a higher specificity is desired. This will depend on the prevalence of IMI in the herd. If we have a low prevalence, it would be advisable to prioritise specificity more to avoid unnecessary treatments [34]. Although both the R1-30% and R2-3SD rules of the Some2 strategy and the R1-10%, R1-20%, R1-30%, R2-2SD, and R2-3SD rules of the Some3 strategy would give good results, the complete model at an overall level that obtained a higher AUC value (0.90), a higher sensitivity (95.2%), and a good specificity value (85.7%) is—R1-30% of the Some2 strategy. If we look for greater specificity, the R1-30% and R2-3SD models of the Some3 strategy are the ones with the highest values (92.9%), while maintaining good sensitivity values (81%). These values are higher than those obtained in studies in cattle, in which a sensitivity of 85% and a specificity of 84% were obtained for a cut-off value of 0.76 $\mu\text{mol 4 MU/min per } \mu\text{L}$ of milk [5]. In sheep livestock, there are no studies on predictive models of NAGase, but the results obtained in this experiment are superior to those obtained in a previous study by our research group, in which non-infectious factors such as parity number, lactation status, milking and production were included in the algorithms, in which an AUC value of 0.80, a sensitivity between 64 and 73% and a specificity between 70 and 79% were obtained [28].

5. Conclusions

The results obtained in this study suggest that NAGase can be considered a good method for early detection of IMI since it can be detected within the first 4 days after infection occurs, which would reduce the severity of the disease, decrease economic losses, and increase animal welfare.

Although the algorithm with the best result (highest AUC) was Rule 1–30% of the Some2 strategy, which obtained a sensitivity of 95.2% and a specificity of 85.7%, depending on the needs of each farm, other algorithms with a higher specificity (up to 92.9%) could be used, maintaining good sensitivity (81%).

For its application at the farm level, the industry still needs to develop biosensors like those already existing for SCC and EC to be able to analyse this enzyme automatically.

Author Contributions: Conceptualisation, Y.M., G.R. and J.R.D.; methodology, A.R., R.M., Y.M. and G.R.; Investigation, Y.M., A.R. and R.M.; Visualisation, Y.M.; Data curation, V.F.; Writing—original draft, Y.M.; Writing—review and editing, Y.M., V.F., G.R. and J.R.D.; Validation, V.F.; Formal analysis, V.F.; Resources, A.R., R.M., G.R. and J.R.D.; Supervision, G.R. and J.R.D.; Funding acquisition, J.R.D.; Project administration, J.R.D. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research was funded by the Ministry of Science and Innovation of Spain, grant number AGL2009–10695.

Institutional Review Board Statement: The animal study protocol was approved by the Ethics Committee of Miguel Hernández University (protocol code DTA-JDS-001-09; date of approval: 15 July 2009).

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: The original contributions presented in the study are included in the article, further inquiries can be directed to the corresponding author.

Acknowledgments: The authors would like to thank the farm staff for all the care they provided to the animals on a daily basis.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflicts of interest.

References

- De Olives, A.M.; Díaz, J.R.; Molina, M.P.; Peris, C. Quantification of milk yield and composition changes as affected by subclinical mastitis during the current lactation in sheep. *J. Dairy Sci.* **2013**, *96*, 7698–7708. [CrossRef] [PubMed]
- Bergonier, D.; Berthelot, X. New advances in epizootiology and control of ewe mastitis. *Livest. Prod. Sci.* **2003**, *79*, 1–16. [CrossRef]
- Gougoulis, D.A.; Kyriazakis, I.; Fthenakis, G.C. Diagnostic significance of behaviour changes of sheep: A selected review. *Small Rumin. Res.* **2010**, *92*, 52–56. [CrossRef]
- Capper, J.L.; Cady, R.A.; Bauman, D.E. Environmental impact of dairy production: 1944 compared with 2007. *J. Anim. Sci.* **2009**, *87*, 2160–2167. [CrossRef]
- Hovinen, M.; Simojoki, H.; Pösö, R.; Suolaniemi, J.; Kalmus, P.; Suojala, L. N-acetyl- β -D-glucosaminidase activity in cow milk as an indicator of mastitis. *J. Dairy Res.* **2016**, *83*, 217–219. [CrossRef]
- Bansal, B.K.; Hamann, J.; Grabowski, N.T.; Singh, K.B. Variation in the composition of selected milk fraction samples from healthy and mastitic quarters, and its significance for mastitis diagnosis. *J. Dairy Res.* **2005**, *72*, 144–152. [CrossRef] [PubMed]
- Larsen, T.; Røntved, C.M.; Ingvarsen, K.L.; Vels, L.; Bjerring, M. Enzyme activity and acute phase proteins in milk utilized as indicators of acute clinical *E. coli* LPS-induced mastitis. *Animal* **2010**, *4*, 1672–1679. [CrossRef] [PubMed]
- Pyörälä, S.; Hovinen, M.; Simojoki, H.; Fitzpatrick, J.; Eckersall, P.D.; Orro, T. Acute phase proteins in milk in naturally acquired bovine mastitis caused by different pathogens. *Vet. Rec.* **2011**, *168*, 535. [CrossRef]
- Leitner, G.; Chaffer, M.; Shamay, A.; Shapiro, F.; Merin, U.; Ezra, E. Changes in Milk Composition as Affected by Subclinical Mastitis in Sheep. *J. Dairy Sci.* **2004**, *87*, 46–52. [CrossRef] [PubMed]
- Barth, K.; Aulrich, K.; Müller, U.; Knappstein, K. Somatic cell count, lactoferrin and NAGase activity in milk of infected and non-infected udder halves of dairy goats. *Small Rumin. Res.* **2010**, *94*, 161–166. [CrossRef]
- Leitner, G.; Chaffer, M.; Zamir, S.; Mor, T.; Glickman, A.; Winkler, M. Udder disease etiology, milk somatic cell counts and NAGase activity in Israeli Assaf sheep throughout lactation. *Small Rumin. Res.* **2001**, *39*, 107–112. [CrossRef] [PubMed]
- Bueso-Ródenas, J.; Arias, R.; Rodríguez, A.M.; Romero, G.; Díaz, J.R. Effect of the settings of two automatic cluster removers (ACRs) on the milking efficiency of Manchega ewes. *Small Rumin. Res.* **2014**, *120*, 224–230. [CrossRef]
- Bueso-Ródenas, J.; Romero, G.; Arias, R.; Rodríguez, A.M.; Díaz, J.R. Effect of automatic cluster removers on milking efficiency and teat condition of Manchega ewes. *J. Dairy Sci.* **2015**, *98*, 3887. [CrossRef] [PubMed]
- Harmon, R.J.; Eberhart, D.E.; Jasper, E.; Langlois, E.; Wilson, R.A. *Microbiological Procedures for the Diagnosis of Bovine Udder Infection*; National Mastitis Council: Arlington, VA, USA, 1990; pp. 1–33.
- Kitchen, B.J.; Middleton, G.; Salmon, M. Bovine milk N-acetyl- β -Dglucosaminidase and its significance in the detection of abnormal udder secretions. *J. Dairy Res.* **1978**, *45*, 15–20. [CrossRef] [PubMed]
- rncorr: Repeated Measures Correlation, R Package Version 0.6.0. Available online: <https://CRAN.Rproject.org/package=rncorr> (accessed on 12 November 2024).
- nlme: Linear and Nonlinear Mixed Effects Models, R package Version 3.1-164. Available online: <https://CRAN.R-project.org/package=nlme> (accessed on 7 November 2024).
- rms: Regression Modeling Strategies, R Package Version 6.8-2. Available online: <https://CRAN.R-project.org/package=rms> (accessed on 14 November 2024).
- The Calibration Curves Package: Assessing the Agreement Between Observed Outcomes and Predictions, R Package Version 2.0.3. Available online: <https://github.com/BavoDC/CalibrationCurves> (accessed on 14 November 2024).
- R Core Team. *R: A Language and Environment for Statistical Computing*; R Foundation for Statistical Computing: Vienna, Austria, 2024. Available online: <https://www.R-project.org/> (accessed on 7 November 2024).
- McDougall, S.; Murdough, P.; Pankey, W.; Delaney, C.; Barlow, J.; Scruton, D. Relationship among somatic cell count California mastitis test, impedance and bacteriological status of milk in goats and sheep in early lactation. *Small Rumin. Res.* **2001**, *40*, 245–254. [CrossRef]

22. Caria, M.; Chessa, G.; Murgia, L.; Todde, G.; Pazzona, A. Development and test of a portable device to monitor the health status of Sarda breed sheep by the measurement of the milk electrical conductivity. *Ital. J. Anim. Sci.* **2016**, *15*, 275–282. [[CrossRef](#)]
23. Tzanidakis, N.; Brozos, C.N.; Voutzourakis, N.; Stefanakis, A.; Malama, E.; Zoller, D.; Zdragkas, A.; Hickford, J.; Sotiraki, S.; Kiossis, E. Effect of abiotic and biotic factors on subclinical mastitis occurrence in low-input dairy sheep production systems. *Small Rumin. Res.* **2021**, *198*, 106341. [[CrossRef](#)]
24. Díaz, J.R.; Romero, G.; Muelas, R.; Alejandro, M.; Peris, C. Effect of intramammary infection on milk electrical conductivity in Murciano-Granadina goats. *J. Dairy Sci.* **2012**, *95*, 718. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. Vasileiou, N.G.C.; Giannakopoulos, A.; Cripps, P.J.; Ioannidi, K.S.; Chatzopoulos, D.C.; Gougoulis, D.A.; Billinis, C.; Mavrogianni, C.; Petinaki, E.; Fthenakis, G.C. Study of potential environmental factors predisposing ewes to subclinical mastitis in greece. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* **2019**, *62*, 40. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
26. Dore, S.; Liciardi, M.; Amatiste, S.; Bergagna, S.; Bolzoni, G.; Caligiuri, V.; Cerrone, A.; Farina, G.; Montagna, C.O.; Saletti, M.A.; et al. Survey on small ruminant bacterial mastitis in Italy, 2013–2014. *Small Rumin. Res.* **2016**, *141*, 91–93. [[CrossRef](#)]
27. Queiroga, M.C. Prevalence and aetiology of sheep mastitis in Alentejo region of Portugal. *Small Rumin. Res.* **2017**, *153*, 123–130. [[CrossRef](#)]
28. Miralles, Y.; Fornés, V.; Roca, A.; Muelas, R.; Díaz, J.R.; Romero, G. Factors affecting N-acetyl- β -D-glucosaminidase as an indicator for mastitis detection in dairy sheep. *Animal* **2024**, *18*, 101111. [[CrossRef](#)]
29. Nagahata, H.; Fuse, M.; Umehara, K.; Gondaira, S.; Higuchi, H.; Hisaeda, K.H.; Kumano, Y. Evaluation of the health status of mammary glands and compositional changes in udder-half milk obtained from dairy goats for milk quality management. *Anim. Sci. J.* **2022**, *93*, e13714. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
30. Leitner, G.; Merin, U.; Glickman, A.; Weisblit, L.; Krifucks, O.; Shwimmer, A.; Saran, A. Factors influencing milk quantity and quality in assaf sheep and goat crossbreds. *South Afr. J. Anim. Sci.* **2004**, *34*, 162–164.
31. McDougall, S.; Pankey, W.; Delaney, C.; Barlow, J.; Murdough, P.A.; Scruton, D. Prevalence and incidence of subclinical mastitis in goats and dairy ewes in vermont, USA. *Small Rumin. Res.* **2002**, *46*, 115–121. [[CrossRef](#)]
32. Bergonier, D.; de Crémoux, R.; Rupp, R.; Lagriffoul, G.; Berthelot, X. Mastitis of dairy small ruminants. *Vet. Res.* **2003**, *34*, 689–716. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
33. Leitner, G.; Silanikove, N.; Merin, U. Estimate of milk and curd yield loss of sheep and goats with intramammary infection and its relation to somatic cell count. *Small Rumin. Res.* **2008**, *74*, 221–225. [[CrossRef](#)]
34. Romero, G.; Reinemann, D.; Alejandro, M.; Díaz, J.R. Goat mastitis detection using daily records of milk conductivity: Comparative results of different algorithms. *Czech J. Anim. Sci.* **2014**, *59*, 428–434. [[CrossRef](#)]

Disclaimer/Publisher’s Note: The statements, opinions and data contained in all publications are solely those of the individual author(s) and contributor(s) and not of MDPI and/or the editor(s). MDPI and/or the editor(s) disclaim responsibility for any injury to people or property resulting from any ideas, methods, instructions or products referred to in the content.

VIII. AGRADECIMIENTOS

Esta tesis no habría podido llevarse a cabo sin el apoyo de una gran cantidad de personas que han estado a mi lado durante todo este proceso.

En primer lugar, quiero agradecer a mis directores Gema y Jose Ramón toda la ayuda prestada durante estos años. Sin todos vuestros conocimientos, sugerencias y aportaciones, esta tesis no hubiese podido escribirse. En el aspecto personal, para mí ha sido muy importante que me hayáis entendido, y facilitado las cosas en los momentos difíciles cuando las fuerzas escaseaban.

Viqui, compañera de este viaje, muchas gracias por todas tus contribuciones y consejos durante este tiempo, y por tu gran apoyo en las épocas de crisis. Ya te he dicho mil veces que no lo habría conseguido sin tu ayuda, gracias una vez más.

También quiero agradecer a todo el equipo de la granja todo su trabajo realizado, y especialmente a Amparo, por estar siempre ahí cuando he necesitado su ayuda.

Gracias a mis chicos, Yeray e Izan, por entender y perdonar todos los momentos que no he podido compartir con ellos, por todo su apoyo técnico, por sus infinitos abrazos de ánimo y por hacerme sentir que era capaz de conseguirlo.

Gracias a mis padres, por seguir preocupándose por mí, incluso a estas alturas de la vida, y preguntar en cada llamada cómo iba la tesis.

Y por último, gracias a Juanmi por estar siempre ahí. Gracias por tu paciencia, por tu apoyo, por escucharme, por todas esas cenas hechas, por aguantarme en los momentos malos y por alegrarte conmigo en los buenos... Sin tu apoyo esto no habría sido posible.