

**TERMOGRAFÍA INFRARROJA EN MUESTRAS DE LECHE Y  
COMPONENTES DE LA MÁQUINA DE ORDEÑO COMO HERRAMIENTA  
PARA LA DETECCIÓN DE MASTITIS SUB-CLÍNICA EN GANADO LECHERO**

por

Abel David Almeida Montenegro

Tesis presentada en cumplimiento parcial de los requisitos para el grado de

MAESTRO EN CIENCIAS  
en  
INDUSTRIA PECUARIA

UNIVERSIDAD DE PUERTO RICO  
RECINTO UNIVERSITARIO DE MAYAGÜEZ  
2014

Aprobado por:

---

Guillermo Ortiz Colón, Ph.D.; P.A.S.  
Miembro, Comité graduado

---

Fecha

---

Héctor L. Sánchez Rodríguez, Ph.D.  
Miembro, Comité graduado

---

Fecha

---

Jaime E. Curbelo Rodríguez, Ph.D.  
Presidente del Comité graduado

---

Fecha

---

David Sotomayor Ramírez, Ph.D.  
Representante de Estudios Graduados

---

Fecha

---

José R. Latorre Acevedo, Ph.D.  
Director de Departamento

---

Fecha

## RESUMEN

La mastitis es la enfermedad más importante en los hatos lecheros mundialmente. En Puerto Rico, las pérdidas económicas asociadas a esta se han estimado en \$765,393 anuales. Durante la respuesta inflamatoria, ocurre un aumento en el flujo de sangre, resultando en un aumento en la temperatura del cuarto mastítico. Este cambio en temperatura podría ser detectado utilizando termografía infrarroja (**TIR**) y utilizarse como indicador del estado de salud de la glándula mamaria. El presente estudio evaluó la TIR como herramienta de detección de mastitis sub-clínica durante el proceso del ordeño en muestras de leche (**TIRM**) y tubos cortos de la unidad de ordeño (**TIRT**). En adición, se determinó el grado de asociación entre la TIR y el recuento de células somáticas (**RCS**) agrupado por patógeno. El estudio se llevó a cabo en una vaquería comercial en Lajas, Puerto Rico. Para determinar la asociación entre la TIR del cuarto mamario y el grado de mastitis, cada cuarto fue categorizado según su RCS en bajo ( $< 200 \times 10^3$  cél.ml<sup>-1</sup>), intermedio ( $\geq 200 \times 10^3$  a  $\leq 750 \times 10^3$  cél.ml<sup>-1</sup>) y alto ( $> 750 \times 10^3$  cél.ml<sup>-1</sup>). La TIRM (n = 127 cuartos) y TIRT (n = 129 cuartos) fueron colectados durante la rutina de ordeño. Muestras escépticas de leche de los cuartos experimentales fueron tomadas para análisis bacteriológicos (n=94). Durante el periodo de estudio se determinó la temperatura ambiental, humedad relativa y temperatura rectal de los animales. No se encontraron diferencias en TIR según los diferentes niveles de RCS. El promedio  $\pm$  error estándar de los grupos de RCS-bajo, RCS-intermedio y RCS-alto fueron  $34.43 \pm 0.12$ ,  $34.53 \pm 0.23$  y  $34.66 \pm 0.51^\circ\text{C}$  para TIRM y  $33.42 \pm 0.20$ ,  $32.98 \pm 0.38$ ,  $33.57 \pm 0.28^\circ\text{C}$  para TIRT, respectivamente. Sin embargo, una alta correlación se observó entre el RCS con TIRM y TIRT ( $r = 0.72$ ;  $P = 0.004$  y  $r = 0.84$ ;  $P = 0.008$ , respectivamente). En conclusión, la TIRM y TIRT como herramienta de diagnóstico de mastitis fue limitada. Esto debido a influencias en variaciones de temperatura durante el ordeño (*e.g.*,  $r =$

0.69;  $P < 0.0001$  entre TIRT y hora de ordeño) y factores climáticos (*e.g.*,  $r = 0.72$ ;  $P < 0.0001$  entre TIRT y temperatura ambiental). Sin embargo, la termografía resultó ser una herramienta prometedora para estimar el tipo de patógeno mastíticos según el RCS. Estos resultados sugieren que estudios futuros son requeridos para determinar la asociación entre la TIR, RCS y patógenos mastíticos.

**Palabras claves:** Mastitis, Termografía infrarroja, Muestras de Leche

## ABSTRACT

Mastitis is the most important diseases in dairy herds worldwide. In Puerto Rico, the economic loses associated to mastitis were estimated in \$765,393 annually. During the inflammatory response an increased in blood flow occurs, resulting in a temperature increment. This increase in temperature could be detected using infrared thermography (**IRT**) and used as a health status indicator of the mammary gland. The present study evaluated the use of IRT as a detection tool of sub-clinical mastitis during the milking process in milk samples (**IRTMS**) and the short milking tubes (**IRTT**). In addition, the association between IRT and somatic cell count (**SCC**) grouped by mastitic pathogens was evaluated. The study was conducted in a commercial dairy herd in Lajas, Puerto Rico. To determinate the association between infrared temperature of mammary quarters and mastitis grade, each quarter was categorized by SCC in low ( $< 200 \times 10^3$  cell.ml<sup>-1</sup>), intermediate ( $\geq 200 \times 10^3 \leq 750 \times 10^3$  cell.ml<sup>-1</sup>) and high ( $> 750 \times 10^3$  cell.ml<sup>-1</sup>). During the milking routine, IRTMS (n = 127 quarters) and IRTT (n = 129 quarters) were collected. Aseptic milk samples of experimental quarters were collected for bacteriological analysis (n=94). In addition, environmental temperature, relative humidity and rectal temperature of the animals were collected during the study. No differences in IRT according to SCC categories were found. Mean IRT  $\pm$  standard error in low-, medium- and high-SCC were 34.43 $\pm$ 0.12, 34.53 $\pm$ 0.23 and 34.66 $\pm$ 0.51°C for IRTMS and 33.42 $\pm$ 0.20, 32.98 $\pm$ 0.38 and 33.57 $\pm$ 0.28°C for IRTT, respectively. However, a high correlation between SCC with IRTMS and IRTT grouped by pathogens were observed ( $r = 0.72$ ;  $P = 0.004$  and  $r = 0.84$ ;  $P = 0.008$ , respectively). In conclusion, IRTMS and IRTT as a mastitic detection tool were limited. This was due to influences in temperature variations during the milking process (*e.g.*,  $r = 0.69$ ;  $P < 0.0001$  between TIRT and milking time) and climatic factors (*e.g.*,  $r = 0.72$ ;  $P < 0.0001$  between IRTT

and environmental temperature). However, IRT resulted to be a promising tool to estimate the type of mastitic pathogen when grouped by SCC. These results suggest future studies are needed to determine the association between IRT, SCC and mastitic pathogens.

**Keywords:** Mastitis, Infrared Thermography, Milk Temperature

## **DEDICATORIA**

Para Dios, mis padres Abel Isaías Almeida y Adriana Montenegro, mi novia Johana Parreño, familiares y amigos en general, los cuales han sido un gran apoyo durante este periodo, ya que me han ofrecido su apoyo moral incondicionalmente y han estado en todo momento junto a mi persona. Para todos ellos dedico este trabajo.

## **AGRADECIMIENTOS**

Agradezco a Dios que me ha permitido continuar con mis estudios a nivel de posgrado. A mis padres, mi novia, familiares, amigos y profesores que me han apoyado en todo momento. Al presidente del comité graduado, Doctor Jaime Curbelo Rodríguez, quien ha sido mi mentor a lo largo de la maestría y me ha guiado, aconsejado y ha formado parte de mi crecimiento profesional. A los miembros del comité graduado Doctor Héctor Sánchez quien con buena voluntad, paciencia y carisma supo aclarar cualquier tipo de dudas y al Doctor Guillermo Ortiz por su colaboración en el desarrollo de la investigación. Un agradecimiento especial al Ingeniero Neftalí LLuch dueño del hato lechero comercial de Puerto Rico “Tai South Farm”, por su gran colaboración y apoyo para mejorar día a día la industria lechera a través de la investigación. A Adalberto de Jesús administrador del hato lechero y a todo el personal de trabajo del mismo, quienes colaboraron de la mejor manera durante la toma de datos de la investigación. Se agradece a todo los compañeros estudiantes graduados y sub-graduados que colaboraron en la toma de datos, Beatriz Quintana, Zoé Crespo, Jorge Caicedo, Valeria Rodríguez, Claudia Acevedo, Adriana Alonso, Alexandra Taboada, Jomar Rosado, René Delgado, Tabatha Lugo, Robert Ryan, Ricardo Cruz, Ángela González.

## TABLA DE CONTENIDO

|  |             |
|--|-------------|
| <b>RESUMEN</b>   | <b>II</b>   |
| <b>ABSTRACT</b>  | <b>IV</b>   |
| <b>DEDICATORIA</b>   | <b>VI</b>   |
| <b>AGRADECIMIENTOS</b>   | <b>VII</b>  |
| <b>TABLA DE CONTENIDO</b>  | <b>VIII</b> |
| <b>LISTA DE TABLAS</b>   | <b>XI</b>   |
| <b>LISTA DE FIGURAS</b>  | <b>XII</b>  |
| <b>1 INTRODUCCIÓN</b>  | <b>1</b>    |
| 1.1 Justificación  | 6           |
| 1.2 Objetivos  | 8           |
| <b>2 REVISIÓN DE LITERATURA</b>  | <b>9</b>    |
| 2.1 Definición de mastitis   | 9           |
| 2.2 Tipos de mastitis  | 10          |
| 2.3 Patógenos más comunes  | 12          |
| 2.4 Mastitis y el proceso inflamatorio de la glándula mamaria  | 15          |
| 2.5 Cambios composicionales en la leche  | 19          |
| 2.6 Variación del recuento de células somáticas en leche   | 21          |
| 2.7 Efecto del contenido de células somáticas sobre la calidad de la leche                               | 25          |
| 2.8 Impacto económico de la mastitis   | 27          |
| 2.9 Técnicas para la detección de mastitis   | 28          |
| 2.10 Termografía infrarroja  | 33          |
| 2.11 Uso de sistemas de termografía infrarroja para evaluar el perfil térmico de los animales domésticos | 36          |
| 2.12 Factores que influyen la temperatura de la ubre   | 39          |
| 2.13 Temperatura de la leche como evaluador de estado de salud de la glándula mamaria                    | 41          |
| <b>3 TERMOGRAFÍA INFRARROJA PARA LA DETECCIÓN DE MASTITIS EN MUESTRAS DE LECHE</b>                       | <b>45</b>   |
| 3.1 Introducción   | 45          |
| 3.2 Objetivos  | 47          |
| 3.3 Materiales y Métodos   | 48          |
| 3.3.1 Descripción del lugar  | 48          |
| 3.3.2 Categorización de cuartos individuales   | 48          |
| 3.3.3 Parámetros climatológicos evaluados  | 48          |
| 3.3.4 Evaluación de síntomas o signos de mastitis  | 49          |
| 3.3.5 Toma de muestras asépticas de leche  | 50          |
| 3.3.6 Toma de imágenes termográficas de muestras de leche  | 50          |
| 3.3.7 Prueba de mastitis californiana de muestras de leche   | 51          |
| 3.3.8 Determinación del recuento de células somáticas en cuartos individuales                            | 51          |
| 3.3.9 Toma de temperatura rectal   | 52          |
| 3.3.10 Parámetros predictivos de diagnóstico de imágenes termográficas                                   | 52          |

|          |   |            |
|----------|---|------------|
| 3.3.11   | Análisis estadístico  | 53         |
| 3.4      | Resultados y discusión  | 57         |
| 3.4.1    | VARIABLES DE TEMPERATURA EN MUESTRAS DE LECHE   | 57         |
| 3.4.2    | VARIABLES DE TEMPERATURA COMO HERRAMIENTA PARA DIAGNOSTICAR CASOS DE MASTITIS.  | 58         |
| 3.4.3    | CORRELACIONES DE LAS VARIABLES DE TEMPERATURA   | 60         |
| 3.4.4    | PARÁMETROS ASOCIADOS CON EL GRADO DE MASTITIS   | 62         |
| 3.4.5    | CORRELACIONES DE LOS PARÁMETROS ASOCIADOS AL GRADO DE MASTITIS  | 63         |
| 3.4.6    | PARÁMETROS DE DESEMPEÑO ANIMAL  | 64         |
| 3.4.7    | EFFECTO DE PATÓGENOS MASTÍTICOS   | 68         |
| 3.4.8    | MODELO PREDICTIVO DE RECuento LINEAL DE CÉLULAS SOMÁTICAS   | 71         |
| 3.5      | Conclusiones y recomendaciones  | 72         |
| <b>4</b> | <b>USO DE TERMOGRAFÍA INFRARROJA EN COMPONENTES DE LA UNIDAD DE ORDEÑO COMO HERRAMIENTA PARA LA DETECCIÓN DE MASTITIS</b> | <b>74</b>  |
| 4.1      | Introducción  | 74         |
| 4.2      | Objetivos   | 76         |
| 4.3      | Materiales y Métodos  | 77         |
| 4.3.1    | Toma de imágenes termográficas infrarrojas de componentes de la máquina de ordeño   | 77         |
| 4.3.2    | Parámetros predictivos de diagnóstico   | 78         |
| 4.3.3    | Análisis estadístico  | 78         |
| 4.4      | Resultados y discusión  | 81         |
| 4.4.1    | VARIABLES DE TEMPERATURA  | 81         |
| 4.4.2    | VARIABLES DE TEMPERATURA COMO HERRAMIENTA DE DIAGNÓSTICO PARA DETECTAR MASTITIS.  | 82         |
| 4.4.3    | CORRELACIONES ENTRE VARIABLES DE TEMPERATURA  | 85         |
| 4.4.4    | PARÁMETROS ASOCIADOS CON EL GRADO DE MASTITIS   | 87         |
| 4.4.5    | CORRELACIONES DE LOS PARÁMETROS ASOCIADOS DEL GRADO DE MASTITIS   | 89         |
| 4.4.6    | VARIABLES DE DESEMPEÑO ANIMAL   | 91         |
| 4.4.7    | EFFECTO DE PATÓGENOS MASTÍTICOS   | 94         |
| 4.4.8    | MODELO PARA PREDECIR EL RECuento LINEAL DE CÉLULAS SOMÁTICAS  | 96         |
| 4.5      | Conclusiones y recomendaciones  | 97         |
| <b>5</b> | <b>CONCLUSIONES GENERALES</b>   | <b>99</b>  |
| <b>6</b> | <b>BIBLIOGRAFÍA</b>   | <b>100</b> |
| <b>7</b> | <b>ANEJOS.</b>  | <b>111</b> |
|          | Anejo 1. Equipos utilizados para medir las variables climáticas y temperatura rectal                                      | 111        |
|          | Anejo 2. Calibración de variables infrarrojas   | 111        |
|          | Anejo 3. Toma de imagen termográfica infrarroja   | 112        |
|          | Anejo 4. Prueba de mastitis californiana  | 112        |
|          | Anejo 5. Prueba de DeLaval Cell Counter   | 113        |
|          | Anejo 6. Colección de muestras asépticas de leche   | 113        |
|          | Anejo 7. Sonda termal HYP3-16-1-1/2-T-U-48-RP colocada en el tubo corto   | 113        |
|          | Anejo 9. Análisis de las imágenes termográficas infrarrojas de las muestras de leche                                      | 114        |
|          | Anejo 10. Análisis de la imagen termográfica infrarroja de los componentes de máquina de ordeño                           | 115        |

Anejo 11. Cambios en la termografía infrarroja de los tubos cortos, temperatura ambiental y temperatura rectal según la hora en la que se tomaron los datos

115

## LISTA DE TABLAS

|   |    |
|---|----|
| Tabla 1. Promedios $\pm$ error estándar de las variables de temperatura en muestras de leche según el recuento de células somáticas.                    | 58 |
| Tabla 2. Parámetros predictivos de diagnóstico de las variables de temperatura y prueba de mastitis californiana  | 59 |
| Tabla 3. Correlaciones simples entre las variables de temperaturas y otras variables analizadas.  | 61 |
| Tabla 4. Evaluación de los promedios $\pm$ error estándar de los parámetros asociados con el grado de mastitis según el recuento de células somáticas.  | 63 |
| Tabla 5. Correlaciones simples entre los parámetros asociados al grado de mastitis.   | 64 |
| Tabla 6. Evaluación de los promedios $\pm$ error estándar de los parámetros de desempeño dependiendo del recuento de células somáticas.                 | 68 |
| Tabla 7. Correlaciones simples entre los parámetros de desempeño animal y otras variables analizadas  | 68 |
| Tabla 8. Evaluación de parámetros evaluadores del grado de mastitis y variables de temperatura según el tipo de patógeno.                               | 70 |
| Tabla 9. Correlaciones de los promedios de las variables analizadas para los patógenos mastíticos.  | 71 |
| Tabla 10. Evaluación de los promedios $\pm$ error estándar de las variables de temperatura en función del recuento de células somáticas.                | 82 |
| Tabla 11. Parámetros predictivos de diagnóstico de las variables de temperatura y la prueba de mastitis californiana CMT.                               | 83 |
| Tabla 12. Correlaciones simples entre las variables de temperaturas y todas las demás variables analizadas.   | 87 |
| Tabla 13. Evaluación de los promedios $\pm$ error estándar de los parámetros asociados grado de mastitis dependiendo del recuento de células somáticas. | 89 |
| Tabla 14. Correlaciones simples entre los parámetros asociados al grado de mastitis y todas las variables analizadas.                                   | 90 |
| Tabla 15. Evaluación de los promedios $\pm$ error estándar de las variables de producción según el recuento de células somáticas.                       | 93 |
| Tabla 16. Correlaciones simples entre los parámetros desempeño animal y variables analizadas.   | 93 |
| Tabla 17. Parámetros evaluadores de mastitis y variables de temperatura real e infrarroja según el patógeno mastítico                                   | 95 |
| Tabla 18. Correlaciones de los promedios de parámetros evaluadores del grado de mastitis y variables de temperatura real e infrarroja de los patógenos. | 96 |

## **LISTA DE FIGURAS**

|  |    |
|--|----|
| Figura 1. Prevalencia de patógenos mastíticos en un hato lechero comercial de Puerto Rico. | 69 |
| Figura 2. Prevalencia de patógenos mastíticos en un hato lechero comercial en Puerto Rico. | 94 |

# 1 INTRODUCCIÓN

La mastitis se define como la inflamación de la glándula mamaria en respuesta a infecciones causadas por patógenos (comúnmente bacterias) y traumas o irritación (Bradley, 2002; Zhao y Lacasse, 2008). La mastitis es una enfermedad de gran importancia en los hatos lecheros debido a que tiene un efecto negativo sobre la salud del animal producción y calidad de la leche, por lo tanto disminuye la rentabilidad de las vaquerías.

Según el informe anual de la industria lechera de Puerto Rico la cantidad de leche descartada a causa altos recuentos de células somáticas (**RCS**) para el año 2010-2011 fue de 338,747 litros lo que se representa en pérdidas de \$287,934.95 en promedio al año. Por otra parte Geary y colaboradores (2012), estimaron el efecto económico de la mastitis sobre la rentabilidad de las vaquerías en Irlanda. Estos concluyeron que a medida que aumenta el RCS de  $< 100 \times 10^3$  cél.ml<sup>-1</sup> a  $> 400 \times 10^3$  cél.ml<sup>-1</sup>; la producción de leche disminuye en un 6.9%. Además, este aumento se asoció con un incremento de 17% en el descarte involuntario de animales, una disminución del ingreso agrícola total de la vaquería de 1.6%, un aumento en los gastos de producción de un 10% y que las utilidades netas de la vaquería por año disminuyan en un 62.4%. En otra investigación Ott (1999), evaluó el impacto económico de la mastitis sub-clínica cuando se presentó un RCS en tanque de almacenamiento  $> 400 \times 10^3$  cél.ml<sup>-1</sup>, asociados a la producción de leche, pérdidas de becerros nacidos, reemplazos de vacas y total de pérdidas por vaca; en hatos lecheros de EE. UU durante 6 meses, el valor de las pérdidas fue: \$274.82, \$2.99, \$17.43 y \$295.24, respectivamente. Datos presentados por Ott (1999) recalcan el impacto de la mastitis sobre la rentabilidad de los hatos lecheros. Por estas razones se recomienda realizar prácticas efectivas para prevenir y controlar dicha enfermedad (Geary *et al.*, 2012).

El proceso de inflamación de la glándula mamaria está acompañado generalmente por una disminución en la actividad de síntesis de leche, cambios composicionales y aumento del contenido de células inmunológicas (Harmon, 1994). En adición, se observa una disminución en la producción de leche, vida productiva del animal, calidad de leche y aumento en los costos de producción.

Existen diferentes categorías de mastitis. Dependiendo de la severidad y sintomatología de la infección, esta se puede clasificar como: sub-clínica, clínica o crónica (Plastridge, 1958; Reneau, 1986; Harmon, 1994). La mastitis sub-clínica, no presenta cambios físicos en la leche; sin embargo, ocurren cambios composicionales en la misma. Por ejemplo, ocurre un aumento en el RCS, pH y conductividad eléctrica (CE), entre los principales. En adición, se pueden observar pérdidas en volumen de producción de leche (Plastridge, 1958; Reneau, 1986; Harmon, 1994). Por otro lado, la mastitis clínica puede resultar en leche anormal, con trazas y/o sangre, el animal puede presentar dolor e hinchazón a nivel de la ubre y disminución en la producción de leche. También, este tipo de mastitis puede estar acompañado de signos sistémicos como fiebre, deshidratación o anorexia (Harmon, 1994). La mastitis crónica generalmente resulta en una inflamación recurrente de la glándula mamaria. La mayoría de los casos de mastitis ocurren en la forma sub-clínica, causando una disminución drástica de la secreción de leche (Plastridge, 1958; Viguier *et al.*, 2009). Cabe mencionar que si no se realiza un monitoreo permanente de la producción de leche por animal, es difícil determinar los animales que presenten mastitis sub-clínica.

Se han identificado alrededor de 137 especies de microorganismos aislados de cuartos mastíticos en ganado bovino lechero (Watts, 1988). Estas se han clasificado en patógenos menores *e.g.*, *Corynebacterium bovis* y *Estafilococos coagulasa negativa*, los cuales

comúnmente no están asociados con casos clínicos ni con marcados cambios composicionales en leche (Thorberg *et al.*, 2009) y en patógenos mayores *e.g.* *Streptococcus agalactiae*, *Staphylococcus aureus* y Coliformes, entre los más comunes. Casos de mastitis causados por patógenos mayores, producen cambios composicionales en la leche y generalmente causan daños permanentes al tejido secretor y por ende representan un mayor impacto económico (Dohoo y Meek, 1982; Reneau, 1986; Harmon, 1994).

Una vez que el patógeno evade la primera línea de defensa de la ubre (*i.e.*, esfínter del pezón, queratina), este frecuentemente gana acceso al interior de la glándula mamaria. El patógeno comienza a multiplicarse, producir enzimas y toxinas que afectan la funcionalidad del epitelio mamario. Los antígenos asociados al microorganismo invasor, activan la cascada de eventos asociados con la producción de mediadores inflamatorios incluyendo prostaglandina F2  $\alpha$  (**PGF 2 $\alpha$** ), histamina, citoquinas, interferones (Harmon, 1994). Estos mediadores activan la segunda línea de defensa correspondiente a la respuesta inflamatoria (Spector y Willoughby, 1963), asociados al proceso de vasodilatación, la cual es responsable de activar los eventos inflamatorios como son: aumento en temperatura, enrojecimiento y aumento en permeabilidad vascular (Montero González *et al.*, 2001; García Barreno, 2008).

Según Auld (2011), durante la inflamación de la glándula mamaria a causa de la invasión de patógenos mastíticos, comúnmente ocurren alteraciones a la integridad del tejido secretor (células secretoras), ocasionando cambios en la tasa de secreción de componentes de la leche. Entre estos están, un aumento en la concentración de ácidos grasos libres, reducción de caseína, aumento de la proteína del suero, cambios en la concentración de minerales y disminuciones en lactosa,  $\alpha$ -lacto albúmina y grasa láctea (Plastridge, 1958; Harmon, 1994; Viguer *et al.*, 2009). Durante el desarrollo de mastitis, una de las principales respuestas es el

aumento de flujo de células inmunes desde la circulación sanguínea hacia la leche como parte del proceso de inflamación; por lo que el RCS en la leche es el principal indicador para evaluar el estado de salud de la ubre (Kehrli y Shuster, 1994; Bruckmaier *et al.*, 2004).

En la actualidad, el consumidor y los procesadores de leche buscan obtener productos lácteos seguros y de alta calidad (Dong *et al.*, 2012). Para obtener una leche de calidad grado “A” el límite máximo permitido de RCS es de  $750 \times 10^3$  cél.ml<sup>-1</sup> de leche en tanque (U.S. Department of Health and Drug Administration, 2011). Por lo mencionado anteriormente, se recomienda que los productores de leche implementen prácticas de manejo que garanticen una producción de leche con RCS bajos a modo de reducir la incidencia de mastitis. Para esto se han implementado técnicas rápidas a nivel de campo incluyendo, la prueba de mastitis californiana (**CMT**, por sus siglas en inglés), estimado de CE y el contador celular de DeLaval (**DCC**, por sus siglas en inglés) entre las más comunes. Sin embargo, estas técnicas poseen algunas desventajas como: subjetividad en los resultados y/o altos costos (Viguié *et al.*, 2009).

Una alternativa para la detección temprana de mastitis es el uso de termografía infrarroja (**TIR**) (Berry *et al.*, 2003; Colak *et al.*, 2008; Polat *et al.*, 2010). La TIR mide la radiación infrarroja emitida por superficies de origen biológico y no biológico generando patrones termales asociados a la superficie de interés (Colak *et al.*, 2008; Polat *et al.*, 2010). Esta tecnología, no es invasiva y permite obtener la visualización del perfil térmico espacial de superficies en tiempo real y las imágenes digitales generadas pueden ser guardadas para su posterior análisis.

Debido a que los animales homeotérmicos como la vaca, poseen una temperatura corporal relativamente estable (Aggarwall *et al.*, 2013), alteraciones en la temperatura corporal profunda del animal generalmente ocurren durante episodios extraordinarios incluyendo episodios de estrés termal severo e infecciones sistémicas, entre otras. En el 2013, Hoffmann y colaboradores

concluyeron que el uso de la TIR resultó una herramienta confiable para estimar, de una forma práctica y no invasiva, el estado de salud de las vacas. Estos autores concluyeron que el uso de la TIR podría ser empleada como una herramienta rápida para detectar cambios en la temperatura de la glándula mamaria bovina con una alta habilidad predictiva. Sin embargo, se debe tomar en cuenta que existen factores climáticos que pueden afectar la temperatura de la piel de la ubre como son la temperatura ambiental, humedad relativa, radiación solar y velocidad del viento (Colak *et al.*, 2008; Hovinen *et al.*, 2008; Polat *et al.*, 2010). En adición, otros factores como son el agua, heces, materia orgánica y orina pueden contaminar la superficie de interés, interfiriendo con la lectura de radiación infrarroja (Curbelo-Rodríguez, 2011). Estos factores intervienen con la capacidad de estimar la temperatura de la superficie de glándula mamaria causando que esta no sea la mejor opción para la toma de imágenes termográficas como herramienta predictiva de mastitis sub-clínica (Berry *et al.*, 2003; Colak *et al.*, 2008; Polat *et al.*, 2010).

Durante el proceso de inflamación asociado a mastitis ocurre un aumento en la perfusión de sangre, la cual va acompañada con un aumento de temperatura local. Tomando en cuenta los factores climatológicos y fisiológicos, el perfil térmico de la leche pudiera ser un buen estimador del estado de salud de la glándula mamaria bovina. Por tal razón, las imágenes termográficas (**IT**) de muestras de leche podrían utilizarse para estimar la temperatura de la leche por ende el estado de salud de la glándula mamaria. En adición, IT de componentes de la máquina de ordeño que tengan contacto directo con la leche por ejemplo tubos cortos de leche y colector de leche de la unidad de ordeño, podrían usarse para estimar la temperatura de la leche. De esta manera, se podría validar una herramienta práctica no invasiva y confiable para detectar casos tempranos de mastitis sub-clínica en ganado lechero bovino.

## 1.1 Justificación

La mastitis sub-clínica es la enfermedad de mayor importancia en los hatos lecheros debido a que es difícil de detectar y es la que mayores pérdidas económicas representa en la industria lechera (Wilson *et al.*, 1997). El RCS en leche (expresado en  $\text{cél.ml}^{-1}$ ) es el indicador más utilizado para estimar el estado de salud de la ubre (Schukken *et al.*, 2003; Lukas *et al.*, 2005). El número de células somáticas que debe de presentar la leche de un cuarto saludable es de  $< 200 \times 10^3 \text{cél.ml}^{-1}$  de leche (Nielen *et al.*, 1995). Sin embargo Puerto Rico, ha adoptado el reglamento sanitario de calidad de leche de EE. UU. para la clasificación de leche grado “A” en donde el límite máximo permitido es de  $750 \times 10^3 \text{cél.ml}^{-1}$  de leche cruda en tanque de almacenamiento. Según datos del programa de mejoramiento de hatos lecheros (**DHIP**, por sus sigla en inglés) menos del 30% de los ganaderos acogidos a este programa cumplen con el límite ideal de clasificación para cuartos saludables ( $< 200 \times 10^3 \text{cél.ml}^{-1}$ ).

Según el informe de la industria lechera de Puerto Rico para el año fiscal 2010-2011, el promedio de RCS de leche cruda de las vaquerías de Puerto Rico fue de  $443,529 \text{cél.ml}^{-1}$  de leche. Lo cual representa que una alta cantidad de ganaderos esté experimentando pérdidas en producción de leche debido al alto RCS (Hagnestam-Nielsen *et al.*, 2009). Hand y colaboradores (2012), determinaron el efecto del RCS sobre la producción de leche. Estos reportaron que animales con valores de RCS de  $200 \times 10^3 \text{cél.ml}^{-1}$  producían desde 0.35 hasta 1.09 kg de leche menos por día, mientras que en animales con valores de RCS de  $2 \times 10^6 \text{cél.ml}^{-1}$  de leche, el rango de pérdida de leche fue de 1.49 a 4.70 kg por día.

En adición Puerto Rico durante el año fiscal 2010-2011 produjo un total de 276, 928,517 Kg de leche de los cuales 1, 179,977 kg de leche cruda no cumplían con los parámetros para producción de leche grado A. Los parámetros que más pérdida de leche ocasionaron fueron:

presencia de antibióticos en la leche con un 36.4% (429,619 kg de leche), RCS con un 28.7% (338,747 kg de leche) y bacterias en leche con un 12.09% (142,769 kg de leche). Es decir que un 77.19% de las pérdidas de leche son ocasionadas por parámetros asociados directamente asociados con la mastitis. Lo que demuestra el impacto negativo que tiene la mastitis sobre la producción de leche y en la rentabilidad de las vaquerías en Puerto Rico.

En adición, se ha proyectado que para el año 2,050 la población mundial aumente a 9.6 billones (U.N., 2012). Este incremento causará un aumento en la demanda de alimentos, por lo cual hay que prepararse para mantener un abasto apropiado de los mismos. La leche al ser un alimento alto en valor nutricional debido a que 3 vasos de 8 onzas al día de esta proveen un 90% calcio, 75% vitamina D, 30% vitamina A, 48% proteína, 33% de potasio, 70% riovflavina, 40% vitamina B12, 60% fósforo y 30% de niacina con respecto a una dieta de 2,000 calorías diarias, sería un alimento de gran importancia para la nutrición humana. Por estas razones los productores de leche deben aumentar esfuerzos para implementar prácticas de manejo las cuales aumenten la eficiencia de producción y así maximizar la producción de leche, siendo rentables, eficientes y a la vez mejorando la salud de los animales. Según lo mencionado anteriormente, un área en la que se puede mejorar es la implementación de un control efectivo de mastitis enfocado en prevención y en la detección temprana (Hovinen *et al.*, 2008).

## 1.2 Objetivos

- Evaluar el uso de la termografía infrarroja en muestras de leche de cuartos individuales como una herramienta alternativa para la detección temprana de mastitis de cuartos individuales a nivel de campo.
- Evaluar el uso de imágenes de termografía infrarroja en componentes de la máquina de ordeño como una herramienta alternativa para la detección temprana de mastitis de cuartos individuales a nivel de campo.
- Evaluar parámetros predictivos de diagnóstico de la termografía infrarroja como herramienta para la detección de mastitis.

## 2 REVISIÓN DE LITERATURA

### 2.1 Definición de mastitis

La mastitis se define como inflamación de la glándula mamaria en respuesta a infecciones causadas por patógenos (comúnmente bacterias) o por traumas/irritación (Bradley, 2002; Zhao y Lacasse, 2008). La mastitis principalmente es causada por una infección intramamaria de origen bacteriológico (Ma *et al.*, 2000), la cual en la mayoría de los casos ingresa a la glándula mamaria a través del esfínter del pezón (Plastridge, 1958). En la glándula mamaria normalmente se presentan diferentes poblaciones de células inmunes, las cuales continuamente están destruyendo agentes infecciosos a modo de evitar que las bacterias invadan el tejido secretor de la glándula mamaria (Kehrli y Shuster, 1994). Sin embargo, algunas bacterias logran ingresar al sistema ductal de la glándula mamaria y empiezan a multiplicarse, aumentan los productos de su metabolismo (químicos atrapanes de células inmunes) e inmediatamente las células inmunológicas atacan a las bacterias (Kehrli y Shuster, 1994). Si las bacterias son eliminadas inmediatamente, solo se produce un leve episodio de inflamación para recuperar el estado de salud de la glándula mamaria. Por otra parte, cuando hay una infección severa, los mecanismos de defensa de la glándula mamaria fallan en eliminar el agente patogénico, no logran evitar que estas se multipliquen y colonicen el tejido mamario. Durante el establecimiento de la infección, una serie de eventos ocasionan un aumento en el reclutamiento de células inmunes (neutrófilos, macrófagos, linfocitos) desde la circulación sanguínea hasta la glándula mamaria, activando el sistema de producción de células inmunes desde la médula ósea. Los productos bacterianos lipopolisacáridos (**LPS**), peptidoglicanos, y ácido lipoteico, se conocen como patrón molecular asociado al patógeno (**PMAP**) (Bannerman *et al.*, 2004) y actúan como mediadores inflamatorios activando la respuesta inflamatoria (aumento de flujo sanguíneo, permeabilidad vascular y vasodilatación)

permitiendo que las células inmunes lleguen al sitio de infección e ingresen desde el torrente sanguíneo hacia la leche (Kehrli y Shuster, 1994). El aumento de flujo sanguíneo, el intercambio de moléculas sangre leche y la vasodilatación causan que la temperatura en el área afectada sea similar a la del tronco del cuerpo (Oviedo-Boyso *et al.*, 2007).

El proceso de inflamación está acompañado comúnmente de una disminución en la actividad de síntesis de leche y cambios composicionales en la misma. Esto ocurre debido a que la actividad microbiana destruye a las células secretoras y la membrana basal se altera por el paso de las células inmunes desde la sangre hacia la leche (Reneau, 1986; Harmon, 1994; Schukken *et al.*, 2003).

## 2.2 Tipos de mastitis

El grado de infección y la duración de esta condición van a determinar el estado de salud de la glándula mamaria, basándose en un análisis bacteriológico o en el recuento de células somáticas (**RCS**), ya sea del cuarto individual o de muestras compuestas (Plastridge, 1958; De Vliegher *et al.*, 2012). La mastitis se clasifica en diferentes categorías como mastitis sub-clínica, clínica y crónica.

La mastitis sub-clínica es causada por una infección que no produce cambios visibles en la apariencia de la leche (Harmon, 1994). Sin embargo, se producen cambios en las propiedades químicas incluyendo aumento en el pH, aumento en la conductividad eléctrica (**CE**) debido al incremento de iones de Na y Cl y cambios composicionales incluyendo disminución de sólidos totales de grasa, reducción de los niveles de lactosa, el total de proteína no se altera pero si disminuye la cantidad caseína y aumentan proteínas del plasma sanguíneo en la misma, debido a que existe una transferencia de componentes desde el torrente sanguíneo hacia la leche (Plastridge, 1958; Dohoo y Meek, 1982; Hagnestam-Nielsen *et al.*, 2009). En adición se presenta

una disminución en el volumen de leche producida debido a la destrucción de las células secretoras (Plastridge, 1958; Harmon, 1994; Schrick *et al.*, 2001), y se afecta la calidad de la leche principalmente por el aumento en el RCS (Nielen *et al.*, 1995). En la mastitis sub-clínica los factores mencionados anteriormente ocurren en ausencia de dolor, hinchazón de ubre y ausencia de coágulos en la leche, lo que hace que su detección sea difícil (Plastridge, 1958; Harmon, 1994).

La mastitis clínica puede ser una enfermedad severa y dolorosa representando un factor significativo sobre el bienestar del animal (Schukken *et al.*, 2003). En general se caracteriza por presentar leche con apariencia anormal (grumos, coágulos, secreción aguada), cambios composicionales, turgencia y dolor a nivel de la ubre (Harmon, 1994; Schrick *et al.*, 2001). Cuando el animal presenta RCS que excedan los  $10 \times 10^6$  cél.ml<sup>-1</sup> de leche es posible que muestre signos sistémicos (Dohoo y Meek, 1982). Los signos sistémicos son aumento en temperatura rectal, letargo y anorexia (Harmon, 1994; Schrick *et al.*, 2001).

Plastridge (1958) definió a la mastitis clínica de dos maneras, moderada y severa. Mastitis clínica moderada es caracterizada por una leve inflamación o endurecimiento de uno o más cuartos mamarios, con una visible secreción anormal de la leche a través de un recipiente de fondo negro. La mastitis clínica severa se caracteriza por presentar una ubre o cuarto mamario muy inflamado y con dolor, la secreción de leche es obviamente anormal (coágulos grandes, pus) y el animal puede mostrar un incremento en la temperatura corporal, pérdida de apetito, depresión y una temprana interrupción de la secreción de leche. En las novillas, la mastitis clínica severa puede resultar en un alto riesgo de descartes o muerte del animal (De Vliegher *et al.*, 2012).

La mastitis crónica es una forma menos común de mastitis la cual tiene una duración extendida de la infección intramamaria (Oviedo-Boyso *et al.*, 2007). Este tipo de mastitis es causada principalmente por bacterias incluyendo *Streptococcus (E.) agalactiae*, *E. uberis*, *Estafilococos aureus (S. aureus*, por sus siglas en inglés) y *Mycoplasma pyogenes*, debido a los diferentes mecanismos que estas presentan para evitar ser eliminadas (Plastridge, 1958; De Vlieghe *et al.*, 2012; Chinchali y Kaliwal, 2014).

### 2.3 Patógenos más comunes

Existen alrededor de 137 especies microbianas (bacterias, hongos y levaduras) que han sido aisladas de la ubre bovina (Watts, 1988). Estos patógenos puede ser del tipo contagioso y ambientales (Larry y Hogan, 2001). Sin embargo por el nivel de infección que presentan estos se ha clasificado en mayores y menores ( Reneau, 1986; Ariznabarreta *et al.*, 2002; Reyher *et al.*, 2012)

Los patógenos mayores más comunes son: *E. agalactiae*, *S. aureus* *E. uberis*, *E. dysgalactiae* y coliformes (Dohoo y Meek, 1982; Reneau, 1986; Harmon, 1994; Ariznabarreta *et al.*, 2002; Reyher *et al.*, 2012). Este grupo de patógenos produce mayores cambios composicionales en la leche y tienen el mayor impacto económico de todos los organismos causantes (Harmon, 1994). Los patógenos menores *C. bovis (C. bovis)* y *Estafilococos coagulasa negativa (ECN)* (Dohoo y Meek, 1982; Reneau, 1986; Harmon, 1994; Ariznabarreta *et al.*, 2002; Reyher *et al.*, 2012). Estos patógenos causan una inflamación moderada con RCS dos o tres veces mayores a que los de cuartos saludables. Comúnmente las infecciones causadas por estos patógenos son detectadas principalmente como mastitis del tipo sub-clínico (Barreiro *et al.*, 2010), y por lo general no se relacionan con mastitis clínica (Harmon, 1994). Los patógenos contagiosos pueden ser considerados como un organismo adaptado a sobrevivir en el hospedero,

específicamente en la glándula mamaria. Estos tipos de bacterias se transmiten de vaca a vaca durante el tiempo de ordeño (Plastridge, 1958; Bradley, 2002).

Los patógenos ambientales se denominan como oportunistas, no son adaptados a sobrevivir con el hospedero. Estos típicamente invaden y se multiplican en la glándula mamaria, generando una respuesta inmune leve y generalmente con una alta tasa de curación espontánea. Estos patógenos principalmente se encuentran en el hábitat de la vaca (suelo, alimento, heces y agua contaminada), siendo los más comunes: los coliformes, especies del tipo Gram negativo (*Escherichia coli* y *Klebsiella spp.*); *Streptococoss* [*E. uberis*, *E. dysgalactiae* y *E. spp.* (ambientales)] y los Enterococos (*Enterobacterium*, *Citrobacterium*, *Enterococos faecium*, *Enterococos fecalis*) (Harmon, 1994; Ferguson *et al.*, 2007). La infección causada por estos microorganismos regularmente produce solo una moderada inflamación causando un leve aumento en el RCS. Por lo general los patógenos ambientales no están asociados con casos clínicos, marcados cambios composicionales en leche o una disminución dramática de la producción de leche (Harmon, 1994).

De los microorganismo mencionados anteriormente; *Escherichia coli*, *E. uberis*, *E. dysgalactiae*, *E. agalataiae*; *S. aureus* y *ECN*; están asociados con cerca del 75 - 80% de los casos de mastitis (Wilson *et al.*, 1997; Barkema *et al.*, 1998; Bradley, 2002). Se ha reportado que en animales que presentaron mastitis sub-clínica los patógenos mayormente aislados eran sepas de *S. aureus*, *E. agalactiae* y *ECN* (Barreiro *et al.*, 2010).

*Estafilococos aureus* se encuentra principalmente en ubres infectadas, debido a que es un patógeno intramamario obligado y posee factores virulentos que le permiten colonizar lesiones presentes en la piel del cuarto mamario. Una vez que gana acceso al interior de la glándula se adhiere al sistema ductal eventualmente colonizando los tejidos secretores formando abscesos en

donde se encapsula por el tejido cicatrizal (NMC, 2013). Esta bacteria se replica rápidamente aumentando la carga bacteriana y por ende produce una reacción inflamatoria la cual está asociada con la infiltración de células somáticas al área alveolar (Chinchali y Kaliwal, 2014). Adicionalmente *S. aureus* posee factores virulentos que le permiten evadir la respuesta inmune del huésped, reduciendo significativamente la tasa de curación espontánea y por tratamientos (Zhang y Maddox, 2000; Cheung *et al.*, 2004).

*Streptococcus agalactiae* es una bacteria oportunista y un patógeno mayor que produce un aumento del RCS, disminuye la producción de leche y afecta de sistema ductal de la glándula mamaria, produciendo irritación e inflamación a nivel de glándula mamaria (NMC, 2013). Se ha observado que este patógeno tiene una resistencia del tipo genético, debido a que presenta los genes que confieren resistencia a varios antibióticos intra-mamarios como eritromicina y tetraciclina (Gao *et al.*, 2012). Por tales razones, la erradicación de este patógeno en hatos lecheros es sumamente difícil convirtiéndolo en uno de los principales patógenos mastíticos.

Los microorganismo del tipo *ECN* son patógenos oportunistas que infectan el canal del pezón y la glándula mamaria a partir de fuentes de la piel o del ambiente (Oliver *et al.*, 2004). Estos microorganismos actualmente están teniendo un amplio rango de estudio puesto que su relevancia clínica y patogénica se encuentra en discusión (Hosseinzadeh y Dastmalchi Saei, 2014). Algunos lo consideran como un patógeno con un amplio rango de infección por sus propiedades virulentas (Zhang y Maddox, 2000), por la alta resistencia a bactericidas (Rajala-Schultz *et al.*, 2009) y la capacidad de causar infecciones a nivel crónico (Gillespie *et al.*, 2009). Sin embargo los *ECN* se encuentran clasificados como patógenos contagiosos menores (Dohoo y Meek, 1982; Reneau, 1986; Harmon, 1994). Se han identificado alrededor de 15 especies de *ECN* aisladas de infecciones intramamarias. Sin embargo, *E. chromogenes*, *E. simulans*, *E. xylosum*, *E.*

*epidermis*, *E. hyircus* y *E. haemoliticus* han sido identificadas como las más comunes (Thorberg *et al.*, 2009; Park *et al.*, 2011). Según Thorberg y colaboradores (2009) no se encontró ningún tipo de comportamiento diferente entre estas bacterias *ECN* en cuanto a RCS y producción de leche, en animales con mastitis sub-clínica.

#### 2.4 Mastitis y el proceso inflamatorio de la glándula mamaria

El proceso de inflamación de la glándula mamaria es una herramienta de defensa del huésped para eliminar cuerpos extraños del tejido estéril (Oviedo-Boyso *et al.*, 2007). El mecanismo de defensa de la glándula mamaria está constituido por factores mecánicos, celulares y solubles. La coordinada acción de estos factores definen la resistencia o la susceptibilidad de la glándula mamaria (Oviedo-Boyso *et al.*, 2007).

El sistema inmune se caracteriza principalmente porque es capaz de reconocer y discriminar entre las moléculas que se producen en el propio organismo y aquellos agentes extraños que lo invaden (Janeway y Medzhitov, 2002). El tejido mamario es protegido por dos tipos de sistemas inmunes, el innato y el adquirido (Oviedo-Boyso *et al.*, 2007). El sistema innato consiste la piel, fagocitos, sistemas complementarios y citoquinas (Janeway y Medzhitov, 2002). La piel es de gran importancia ya que es la barrera exterior que protege al organismo. Por tal razón es necesario mantenerla limpia y saludable. Mientras que para el sistema inmune adquirido los complementos son anticuerpos, linfocitos T y B y citoquinas (Janeway y Medzhitov, 2002). Estos sistemas interactúan entre ellos para proveer protección al tejido mamario contra agentes infecciosos. La respuesta inmune innata activa a la respuesta inmune adquirida, la cual a su vez usa los mecanismos efectores del sistema inmune innato para eliminar los agentes extraños (Oviedo-Boyso *et al.*, 2007). La inmunidad innata, es la que predomina en los eventos tempranos de infección respondiendo y reconociendo a diferentes tipos de

microorganismos incluso si estos invaden por primera vez a la glándula mamaria (Oviedo-Boyso *et al.*, 2007).

El esfínter del pezón es la primera línea de defensa que presenta la glándula mamaria, este se mantiene cerrado entre ordeños, gracias al músculo del esfínter, el cual crea una barrera física entre el exterior de la vaca y el interior de la glándula mamaria (Sordillo *et al.*, 1997). En adición, el orificio del pezón está recubierto internamente por queratina, sustancia serosa originada del epitelio escamoso estratificado la cual sirve como barrera física y química para evitar el paso de microorganismos hacia la cisterna del pezón (Sordillo *et al.*, 1997; Oviedo-Boyso *et al.*, 2007). En la queratina se han identificado componentes anti-bacteriales y bacteriostáticos como ácidos grasos esterificados, no esterificados y proteínas catiónicas que inducen cambios en la osmolaridad de la membrana celular de las bacterias y otros microorganismos (Treece *et al.*, 1966; Bitman *et al.*, 1991).

Por otra parte, si el patógeno tiene la capacidad de superar la primera línea de defensa de la glándula mamaria, este gana acceso al interior de la misma y activa la segunda línea de defensa. Esta consiste en la activación de elementos del sistema inmune innato de la vaca incluyendo, neutrófilos, macrófagos y leucocitos, entre otros (Sordillo *et al.*, 1997; Oviedo-Boyso *et al.*, 2007). En respuesta al ataque o presencia de bacterias se activan los macrófagos que se encuentran en la leche o en el tejido epitelial mamario, para que reconozcan al patógeno invasor (Sordillo *et al.*, 1997). La interacción antígeno-anticuerpo y factores complementarios (c5), genera la producción de mediadores inflamatorios los cuales van a activar la respuesta inflamatoria (Spector y Willoughby, 1963; Oviedo-Boyso *et al.*, 2007; Stevens *et al.*, 2012). Esta respuesta inflamatoria principalmente es regulada por los mastocitos que son células derivadas de células madres, las cuales se localizan principalmente en los tejidos vasculares (Frenzel y

Hermine, 2013). Los mastocitos contienen varios reguladores pro-inflamatorios como son: histamina, prostaglandinas y citoquinas (Theoharides *et al.*, 2012). Los mastocitos son activados por el factor complementario c5a para liberar los mediadores inflamatorios (Erdei, 2004). Al ser liberada la histamina va a causar vasodilatación y un incremento en la permeabilidad vascular (OMahony *et al.*, 2011), además la histamina actúa sobre las células endoteliales para que se generen moléculas de adhesión celular (E-selectina) e intracelular (ICAM-1) y de esta manera facilitar el paso de neutrófilos desde la sangre hacia el área de infección (Oviedo-Boyso *et al.*, 2007). La prostaglandina F2  $\alpha$  también es un mediador de la vasodilatación y permeabilidad micro-vascular (Gomez *et al.*, 2013). En adición, la vasodilatación es responsable de activar los eventos inflamatorios como son: disminución de la velocidad de paso del flujo sanguíneo, aumento en la permeabilidad vascular, aumento en temperatura y enrojecimiento (Montero González *et al.*, 2001; García Barreno, 2008); con el objetivo de aumentar el flujo de sangre hacia el área de infección (Newman, 2013).

La membrana bacteriana se compone de diferentes estructuras a cargo de proveer soporte, integridad y semi-permeabilidad. Los componentes de las membranas asociados a estos son LPS, peptidoglicanos y ácido lipoteico, las cuales representan el PMAP (Bannerman *et al.*, 2004). El PMAP es identificado por los receptores tipo “toll” (**RTT**) que se encuentran en la células inmunes (macrófagos) (Rosenberger y Finlay, 2003; Stevens *et al.*, 2012) y por los mastocitos (Frenzel y Hermine, 2013). Las estructuras PMAP interactúan con receptores específicos, RTT4, reconociendo bacterias Gram negativas mientras que el RTT2 es responsable de reconocer a las Gram positivas (Oviedo-Boyso *et al.*, 2007). Esta interacción induce a una producción de mediadores inflamatorios como las citoquinas (IL-8, IL12), prostaglandina (**PG**)F<sub>2 $\alpha$</sub>  y E<sub>2</sub>, histamina y factores complementarios (c5a, c3a) (Kehrli y Shuster, 1994). Los factores

complementarios son moléculas quimio-atrayentes esenciales para proteger a la glándula mamaria contra patógenos, debido a que atraen a los macrófagos, neutrófilos y leucocitos al área de insulto. En adición, los factores del tipo c5 pueden ser producidos localmente por la glándula mamaria. (Stevens *et al.*, 2012). Los LPS estimulan las proteasas de los macrófagos para generar c5a a partir del c5. El factor c5a, actúa sobre los neutrófilos a bajas concentraciones siendo un potente quimio atrayente e inductor de la actividad fagocítica de las células inmunológicas (Stevens *et al.*, 2012).

En adición, los linfocitos son esenciales y fundamentales para prevenir infecciones de la glándula mamaria (Sordillo *et al.*, 1997). Estos reconocen una gran variedad de antígenos a través de los receptores que poseen en su membrana y de esta manera definen la especificidad y variedad de las bacterias que están atacando al huésped y así el sistema inmune identifique a lo que se va a enfrentar (Oviedo-Boyso *et al.*, 2007). Existen diferentes subpoblaciones de linfocitos asociadas a la respuesta inmune del huésped. Los linfocitos T reconocen y eliminan microorganismos patogénicos, mientras que los linfocitos B están a cargo de producir anticuerpos. Los linfocitos del tipo T se clasifican en T $\alpha\beta$  (CD4<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup>). Los linfocitos T CD4<sup>+</sup> tiene una función de ayudantes, ya que estos activan el complejo molecular de reconocimiento (antígeno, linfocito B y macrófagos), y los linfocito T CD8<sup>+</sup> actúan como eliminadores de la células afectadas del hospedero o como controladores de la respuesta inmune durante la infección bacteriana (Sordillo *et al.*, 1997; Oviedo-Boyso *et al.*, 2007)

La actividad del sistema inmune está regulada por la producción de sustancias pro inflamatorias como las citoquinas, las cuales incrementan la capacidad fagocítica de los macrófagos y neutrófilos. Además de promover el reclutamiento de neutrófilos al área de insulto, las citoquinas inducen la maduración de células dendríticas y controlan la respuesta inmune

adquirida (Sordillo *et al.*, 1997; Oviedo-Boyso *et al.*, 2007; Wellnitz y Bruckmaier, 2012). En adición, las citoquinas y el factor c5a formados por la interacción macrófagos-c5 activan los mastocitos los cuales en respuesta liberan histamina. Este compuesto actúa sobre las células endoteliales causando que se expresen moléculas de adhesión celular (E-selectina) e intracelular (ICAM-1), que facilitan el paso de neutrófilos desde la sangre hacia el área de infección (Oviedo-Boyso *et al.*, 2007).

## 2.5 Cambios composicionales en la leche

Según Auldist (2011), durante la inflamación de los cuartos mamarios a causa de infecciones bacterianas ocurre alteración de la integridad tejido secretor y ruptura entre las uniones de las células epiteliales “Tight junction”, generando que existan alteraciones composicionales en la leche mastítica. Algunos ejemplos de esto son el aumento en la concentración de ácidos grasos libres, reducción de caseína y por ende un aumento de la proteína del suero, cambios en la concentración de minerales, disminución en lactosa,  $\alpha$ -lacto albúmina y grasa en leche, debido a la disminución de la actividad de síntesis del tejido mamario causado por el daño que sufren las células secretoras (Plastridge, 1958; Harmon, 1994; Viguier *et al.*, 2009).

Componentes lácteos como lactosa y  $\alpha$ -lacto albúmina pueden escapar fuera del alveolo entre las células epiteliales dañadas, a través de las uniones de hendidura o comunicantes “gap junction” por lo que se pueden utilizar como indicadores del grado de infección al medir sus concentraciones en sangre y/o en la orina (Harmon, 1994). La concentración de proteína total láctea también puede verse afectada por la mastitis, en particular variaciones en sus componentes (Urech *et al.*, 1999). El contenido de caseína disminuye en la leche con mastitis por un incremento en la actividad proteolítica debido a que los neutrófilos polimorfo nucleares producen proteasas (Mehrzaad *et al.*, 2005). Esto causa que la calidad de derivados lácteos disminuya (Sapru

*et al.*, 1997), mientras que los componentes del suero de la leche (*i.e.*, albúmina, lactoferrina, inmunoglobulinas) aumentan para compensar la disminución de caseína y de esta manera regular la osmolaridad (Urech *et al.*, 1999). Los componentes del plasma sanguíneo pasan a la leche, debido al aumento del flujo sanguíneo y por los cambios en permeabilidad vascular que sufren las células secretoras (Kitchen, 1981). Según Urech y colaboradores (1999) la composición de la proteína total en la leche con mastitis sub-clínica puede variar. En cuatro vacas las cuales presentaron promedios de RCS para los cuartos analizados con mastitis ( $293 \times 10^3$  cél.ml<sup>-1</sup>) vs saludable ( $84 \times 10^3$  cél.ml<sup>-1</sup>) observaron que la porción de caseína en la leche fue de 82.5 vs 80.8%; mientras que la porción de proteínas del suero fue de 12.9 vs 14.3% de total de la porción de proteína, respectivamente.

La mastitis también causa cambios en el contenido de iones (Milner *et al.*, 1996). Al verse afectada las concentraciones aniones. Cuando la vaca presenta mastitis las concentraciones de iones aumentan, lo cual incrementa la CE en la leche de tal manera que este valor se usa para determinar si hay o no hay mastitis (Kitchen, 1981; Nielen *et al.*, 1992). Los fluidos extracelulares contienen iones de cloruro, sodio, hidrógeno, potasio e hidróxido, los cuales pasan desde la sangre hacia la leche (El Zubeir *et al.*, 2005; Zhao y Lacasse, 2008). En cuartos mastíticos también se ha observado un cambio en el contenido de minerales debido a que ocurre una disminución en los niveles de calcio y fósforo, ya que estos están asociados con la caseína y por la desorganizada síntesis de esta, se observa una disminución en el contenido de minerales (El Zubeir *et al.*, 2005).

El pH aumenta desde valores típicos de 6.6 a 6.8 debido al movimiento de iones desde la sangre a la leche (Kitchen, 1981). Además otras enzimas y proteínas del suero originadas a partir del tejido dañado, la sangre, o leucocitos son elevadas en la leche incluyendo catalasa, lactato

deshidrogenasa, lipasa, n-Acetil- $\beta$ -D- glucosaminidasa (**NAGasa**) y varias estereasas (Urech *et al.*, 1999). Debido a la estrecha relación que existe entre el proceso inflamatorio y los cambios composicionales en la leche, la medición de ciertos componentes ha sido utilizada para monitorear el estado de salud de la glándula mamaria. Entre estos se están el RCS, catalasa, NAGasa, cloro, sodio y albumina del suero en leche (Harmon, 1994; Kitchen, 1981; Viguier *et al.*, 2009). En adición, los factores mencionados anteriormente están asociados con una disminución en la producción de leche, calidad de leche y un aumento en los costos de producción.

## 2.6 Variación del recuento de células somáticas en leche

Durante el desarrollo de la mastitis, una de las principales respuestas es el aumento de flujo de células somáticas desde la sangre hacia la leche, debió a la respuesta inflamatoria, generando un aumento dramático del RCS en leche (Kehrli y Shuster, 1994; Bruckmaier *et al.*, 2004). Varios autores (Dohoo y Meek, 1982; Reneau, 1986; Schutz *et al.*, 1990; Harmon, 1994; Kehrli y Shuster, 1994; Laevens *et al.*, 1997; Olde Riekerink *et al.*, 2007b; Dufour *et al.*, 2011) han reportado que el RCS puede ser influenciado por varios factores incluyendo el estado de infección, la edad del animal, estado de lactación, número de partos, estrés, época y manejo, entre otros.

Sin embargo, el factor que causa mayor impacto sobre el RCS es la incidencia de infecciones intramamarias (Dohoo y Meek, 1982; Reneau, 1986; Harmon, 1994). El estado de infección de la glándula mamaria va a depender del tipo de agente etiológico (Harmon, 1994) y de factores genéticos, ambientales y fisiológicos que afectan los mecanismos de defensa del hospedero y por ende de la glándula mamaria (Sordillo, 2005). De Haas y colaboradores (2002, 2004), evaluaron la asociación que existe entre los patógenos mastíticos asociados con mastitis

clínica y el RCS, basados en las desviaciones de la curva típica de RCS durante la lactación. Estos autores reportaron que el patrón de comportamiento de la curva de RCS por *Escherichia coli* estuvo significativamente asociado con la presencia de pequeños aumentos de RCS. En estos estudios *S. aureus* fue asociado con un amplio aumento de RCS, mientras que *E. dysgalactiae* y *E. uberis* no se relacionaron con ningún tipo de patrón definido de aumento de RCS.

La edad del animal, es otro factor que puede influenciar el RCS (Dohoo y Meek, 1982; Harmon, 1994). Laevens *et al.* (1997) utilizando 44 animales saludables, reportaron el efecto de número de pariciones sobre el RCS. Estos autores encontraron que el promedio de RCS a lo largo de la lactación para animales de una lactancia fue de  $44.5 \times 10^3$  cél.ml<sup>-1</sup> comparado con animales de tres lactancias, donde el promedio de RCS fue de  $52.9 \times 10^3$  cél.ml<sup>-1</sup>. Además, Brolund (1985) reporta que la media geométrica de RCS incrementó, en vacas libres de mastitis de primera lactancia ( $28 \times 10^3$  cél.ml<sup>-1</sup>) comparados con vacas de cuatro o más lactaciones ( $72 \times 10^3$  cél.ml<sup>-1</sup>), concluyendo que al avanzar el número de lactaciones (edad del animal) aumenta el RCS. Además, se ha observado que animales de mayor edad tienen una mayor respuesta inmune al ataque de patógenos (Dohoo y Meek, 1982; Harmon, 1994). Schutz y colaboradores (1990) reportaron que animales saludables de primer parto presentaron menores RCS según la escala logarítmica usada por el DHIP relativo a animales de tres o más lactancias (3.15 vs 3.98 respectivamente)

El estado de lactación también ha sido relacionado con la variación en el RCS (Dohoo y Meek, 1982; Harmon, 1994; Milner *et al.*, 1996). Se ha observado que el RCS aumenta durante el periodo pos-parto y posteriormente disminuye mientras la lactancia avanza (Laevens *et al.*, 1997; Santman-Berends *et al.*, 2012). En adición Sheldrake y colaboradores (1983) concluyeron que independientemente del estado de infección que presenten los animales, inmediatamente después

del parto se va a presentar valor elevado de RCS. Otros investigadores, mencionan que el leve aumento que se observa de RCS al final de la lactación está asociado al fenómeno de dilución, es decir que según aumenta el rendimiento en leche el RCS disminuye en cuartos que no presentan una infección. (Reneau, 1986; Emanuelson y Funke, 1991; Laevens *et al.*, 1997). Esta dilución es un efecto giratorio entre el volumen de leche y el RCS (Green *et al.*, 2006). Es decir, al disminuir el RCS en ausencia de una infección, el rendimiento de leche va a ser mayor y este incremento en volumen de leche causa que la concentración de células somáticas sea menor por unidad de volumen.

La época del año es otro de los factores que puede causar una variación en el RCS. En regiones templadas se ha observado que en los meses de invierno el RCS es menor comparado con los meses de verano (Dohoo y Meek, 1982). Esta diferencia en el contenido de células somáticas no se debe directamente a un efecto del aumento de la temperatura ambiental sobre el animal, sino a que por estas y por la humedad, se desarrollan una mayor cantidad de patógenos, a los cuales el animal está expuesto (Reneau, 1986; Harmon, 1994). En Puerto Rico Curbelo-Rodríguez (2007), encontró que durante la época de mayor temperatura (julio, agosto y octubre) se presentó un mayor RCS (sobre  $600 \times 10^3$  cél.ml<sup>-1</sup>). Este aumento de RCS coincide con que en esos meses es donde hay altas temperaturas y humedad generando que se desarrollen mayor cantidad de patógenos que causen infección. En adición, el animal al estar en estrés termal, el consumo de alimento se ve afectado (Bouraoui *et al.*, 2002) y por ende puede causar un desbalance en el sistema inmune, haciendo que el animal este más propenso a enfermedades (Sordillo, 2005). En otra investigación Olde Riekerink y colaboradores (2007a), observaron que hubo un aumento en RCS y en la diversidad de bacterias aisladas en los meses de agosto y septiembre.

El estrés a causa de la producción, estabulación/manejo es otro factor que causa variación en el RCS (Dohoo y Meek, 1982; Reneau, 1986; Harmon, 1994). En adición el uso de suplementos hormonales para aumentar la producción genera un aumento en el RCS. Una investigación realizada por Willeberg (1993) estimó que al usar la hormona somatotropina bovina aumenta la incidencia de mastitis clínica en un 15 hasta 45%. También se ha observado un aumento en el RCS en animales que no se han dividido en grupos (novillas/adultas o altas/bajas productoras). Grupos mezclados presentaron un RCS en tanque de  $170 \times 10^3$  cél.ml<sup>-1</sup> a  $424 \times 10^3$  cél.ml<sup>-1</sup>, este conteo de RCS se realizó cuatro días después de la mezcla de grupos. Sin embargo no se presentaron diferencias en los RCS semanales (Kay *et al.*, 1977).

Variaciones en el RCS se han observado también entre los ordeños de la mañana y la tarde. Esto ocurre como resultado de una dilución proporcional, es decir que hay un aumento en el RCS debido a una reducción del volumen de leche, relativo al intervalo entre ordeños (Dohoo y Meek, 1982; Reneau, 1986; Harmon, 1994). Esta variación puede ser mayor en animales de alta producción comparado con los de baja producción (Reneau, 1986). En una investigación realizada por Olde Riekerink y colaboradores (2007b) se encontró que existe la variación diurna del RCS entre ordeños en animales saludables. Durante el pre-ordeño de la mañana se obtuvo  $80 \times 10^3$  cél.ml<sup>-1</sup> y una hora pos-ordeño se observó un aumento en el RCS a  $250 \times 10^3$  cél.ml<sup>-1</sup> por un efecto de dilución. Durante el día los niveles de RCS fueron disminuyendo hasta el ordeño de tarde (10 horas post-ordeño am), en donde se observó que el RCS fue de  $50 \times 10^3$  cél.ml<sup>-1</sup>. Los autores observaron que cuando el animal presentó infección mamaria, es decir un alto RCS, hay un incremento en la porción de poli-morfo neutrófilos después del proceso de ordeño. Por tales razones se recomienda tomar las muestras de leche para evaluar RCS antes de empezar el proceso de ordeño (Dohoo y Meek, 1982; Reneau, 1986; Harmon, 1994).

Según todo lo mencionado anteriormente hay varios factores que alteran el RCS pero estas variaciones son menores comparados con el nivel de RCS que se presenta cuando hay una infección intramamaria, por lo cual son considerados de menor importancia (Dohoo y Meek, 1982; Reneau, 1986; Harmon, 1994).

## 2.7 Efecto del contenido de células somáticas sobre la calidad de la leche

Un alto RCS en la leche podría afectar la seguridad alimentaria y aumentar el riesgo de encontrar residuos de antibióticos en la leche (Ruegg y Tabone, 2000). La Unión Europea<sup>1</sup> y la oficina de regulación de la industria lechera en Puerto Rico (**ORIL-PR**) destaca que la leche utilizada para el consumo humano tiene que provenir de animales saludables (Viguiet *et al.*, 2009). Por tal razón, actualmente el consumidor y el productor buscan tener una leche de calidad, para tener productos seguros y una producción estándar de derivados lácteos (Dong *et al.*, 2012). Para producir leche de calidad grado “A” hay algunos factores que se deben tener en cuenta, siendo uno de ellos el RCS en leche (U.S. Department of Health and Drug Administration, 2011). Se ha establecido según una ley federal que el límite máximo de RCS que puede tener un productor es de  $750 \times 10^3$  cél.ml<sup>-1</sup> (U.S. Department of Health and Drug Administración, 2011).

Como se ha mencionado anteriormente, el RCS es la principal característica que sirve como indicador de la calidad de leche, pero hay que mencionar que el RCS *per se* no es el que afecta la calidad de la leche sino más bien esto se debe a enzimas que están asociadas al alto RCS (Ma *et al.*, 2000; Santos *et al.*, 2003; Barbano *et al.*, 2006). Debido al proceso de inflamación que sufren los cuartos mamarios a causa de la infección, hay una disminución de componentes que se forman a partir de la síntesis de *novo* y hay un aumento de elementos desde la sangre hacia la leche (Kitchen, 1981). Estos elementos incluyen enzimas (*i.e.*, plasmina es una proteasa que

---

<sup>1</sup> Regulación 853/2004

degrada caseína y la lipoproteína lipasa que degrada grasas) que aumentan la actividad proteolítica y lipolítica, las cuales se han relacionado con una disminución en la calidad sensorial y vida útil de la leche (Santos *et al.*, 2003). Según Ma y colaboradores (2000), un bajo nivel de RCS en leche ( $< 100 \times 10^3$  cél.ml<sup>-1</sup>), mantuvo una alta calidad organoléptica durante un periodo de vida anaquel de 21 días, mientras que en leche con un alto RCS ( $750 \times 10^3$  cél.ml<sup>-1</sup>) se detectaron defectos sensoriales entre 14 a 21 días. Los principales defectos que se detectaron fueron un sabor rancio y amargo, resultado de la alta proteólisis y lipólisis. En otra investigación Santos *et al.*, (2003) concluyeron que la combinación de bajo RCS en leche y baja temperatura de almacenamiento ( $< 6^\circ\text{C}$ ) puede ayudar a mantener un mejor sabor y calidad de la leche de hasta 61 días.

Según el U.S. Department of Health and Drug Administration (2011), el límite permitido en EE. UU. es de  $750 \times 10^3$  cél.ml<sup>-1</sup> siendo este uno de los límites más altos permitidos a nivel mundial. Esto afecta a la exportación de productos lácteos a mercados internacionales, puesto que en otros países de la Unión Europea, Nueva Zelanda, Australia y Suiza tienen un límite máximo de RCS de  $400 \times 10^3$  cél.ml<sup>-1</sup> (Dong *et al.*, 2012). Sin embargo, algunos estados de EE. UU. han disminuido el límite permitido de RCS (*i.e.*, California  $600 \times 10^3$  cél.ml<sup>-1</sup>, Óregon  $500 \times 10^3$  cél.ml<sup>-1</sup>, Idaho  $400 \times 10^3$  cél.ml<sup>-1</sup>) (Norman *et al.*, 2011).

Por las razones explicadas anteriormente el gobierno de EE. UU. propuso disminuir el límite permitido de RCS a  $400 \times 10^3$  cél.ml<sup>-1</sup> pero esto no fue aprobado durante la conferencia nacional sobre envíos de leche interestatales (NCIMS, por sus siglas en inglés) en mayo del 2011 (Dickrell, 2011).

## 2.8 Impacto económico de la mastitis

La mastitis es una de las enfermedades más importantes en la producción de leche, debido al efecto negativo que tiene sobre la salud del animal y la eficiencia de producción de leche. En adición, es la enfermedad más común e importante en los hatos lecheros a nivel mundial (Halasa *et al.*, 2007), ya que está asociada a substanciales pérdidas económicas y por ende a un incremento en los costos de producción (Andersen *et al.*, 2010).

En Puerto Rico, según el informe anual de la industria lechera para el año fiscal 2010-2011. Determinó que 1, 179,977 kg de leche no estaban aptos para cumplir con el programa de grado “A”. Los parámetros que tuvieron un mayor impacto en la leche decomisada fueron presencia de antibióticos en la leche con un 36.4% (429,619 kg de leche), RCS con un 28.7% (338,747 kg de leche) y bacterias en leche con un 12.09% (142,769 kg de leche). Es decir que un 77.19% de la leche no apta para grado “A” son ocasionadas por parámetros asociados directamente con la mastitis. Al ver el impacto negativo de la mastitis sobre la calidad de leche para grado “A”, causa que la mastitis tenga un impacto negativo en la economía de la industria lechera. Debido a que el decomisó de leche generó pérdidas de \$360,879.69 por leche con presencia de antibióticos, \$284,587.48 por alto RCS y \$119,925.96 por alto contenido de bacterias. Teniendo un total de pérdidas de \$765,393.13 ocasionados por leche decomisada que no cumple con los parámetros para grado “A” a causa de problemas asociados a mastitis.

El total de pérdidas estimadas para los ganaderos de EE. UU. a causa de las mastitis es de \$400 a \$500 millones al año (Janzen, 1970). Varios programas de control indican pérdidas anuales por vaca entre \$23.26 y \$154.34 (Janzen, 1970). En otra investigación Blosser (1979) evaluó las pérdidas económicas utilizando el 86% de la población de vacas lecheras en EE. UU., reportando pérdidas anuales a causa de mastitis en los siguientes renglones: reducción de

producción de leche, \$81.32; leche descartada, \$12.88; costos de veterinario/medicinas, \$5.83; aumento de trabajo, \$2.28; disminuye el precio de leche, \$5.72; incremento los costos de reemplazo, \$9.36; para un total de \$117.35/vaca/año. Shim y colaboradores (2004) evaluaron la pérdida de producción de leche y los costos de tratamiento de mastitis leche entre los años 1994 – 1996, reportando pérdidas de  $230 \pm 172$  kg de leche e incurriendo a unos costos adicionales por tratamientos por  $\$94 \pm 51$  por lactación, respectivamente. Bar y colaboradores (2008) en hatos lecheros de Nueva York estimaron el costo total de un caso de mastitis, siendo de \$179 distribuidos entre \$115 por pérdidas de producción de leche, \$14 por incremento en mortalidad y \$50 en los costos relacionados a tratamientos. Por las razones expuestas anteriormente la mastitis tiene un gran impacto económico en la rentabilidad de las vaquerías y se recomienda tener un control basado en programas continuos de prevención y eliminación de infección (Janzen, 1970).

## 2.9 Técnicas para la detección de mastitis

Se han desarrollado técnicas rápidas a nivel de campo para determinar y evaluar la calidad de la leche a través del diagnóstico de la infección (Viguier *et al.*, 2009). Se han implementado técnicas para la detección temprana de mastitis utilizando indicadores de inflamación presentes en la leche como por ejemplo: células somáticas, aumento de iones en leche, pruebas de coagulación de la leche, análisis enzimático, entre otras (Pyörälä, 2003).

La prueba de mastitis californiana (**CMT**, por sus siglas en inglés) fue desarrollada en el año 1957 y hasta el momento es utilizada en hatos lecheros alrededor del mundo (Schalm y Noorlander 1957; Fosgate *et al.*, 2013). Esta prueba permite estimar indirectamente el RCS en muestras de leche (Barnum y Newbould, 1961). La prueba, es de bajo costo, rápida, se puede usar a nivel de campo y la persona que realice la prueba no necesita un entrenamiento extenso (Sanford *et al.*, 2006). La solución de CMT contiene un detergente aniónico y bromocresol

(Carroll and Schalm, 1962). Este detergente degrada las membranas de las células somáticas exponiendo su ADN, de esta manera se unen los ácidos nucleicos formando un gel, el cual de acuerdo a su viscosidad estimará la cantidad de células somáticas (Schalm y Noorlander, 1957; Viguier *et al.*, 2009). Barnum y Newbould (1961) describen el sistema de clasificación para determinar el valor de CMT el cual consta de resultados negativos (0 a  $200 \times 10^3 \text{cél.ml}^{-1}$ ), trazas ( $200 \times 10^3$  a  $400 \times 10^3 \text{cél.ml}^{-1}$ ), grado 1 ( $400 \times 10^3$  a  $1,200 \times 10^3 \text{cél.ml}^{-1}$ ), grado 2 ( $1,200 \times 10^3$  a  $5,000 \times 10^3 \text{cél.ml}^{-1}$ ) y grado 3 ( $> 5,000 \times 10^3 \text{cél.ml}^{-1}$ ) (McFadden, 2011). El CMT es una prueba relativamente simple para usar, sin embargo puede ser difícil de interpretar debido a la subjetividad que presenta (Sanford *et al.*, 2006).

Otra prueba de campo para evaluar el estado de salud de la glándula mamaria es el estimador portable de células somáticas (**PORSec**). El PORSec es una prueba cuantitativa la cuál usa un algoritmo para convertir los resultados de una reacción enzimática en un estimado de RCS. Sin embargo, el periodo para obtener los resultados en esta prueba es de 45 minutos (Rodrigues *et al.*, 2009). Esta prueba genera una reacción colorimétrica producida por la reacción química de un sustrato (tinte) y la enzima esterase, la cual se encuentra en la membrana de las células somáticas. Luego se utiliza una función logarítmica para estimar el RCS asociado en el color que presentó la reacción (Rodrigues *et al.*, 2009; Viguier *et al.*, 2009; Brandt *et al.*, 2010).

La medida de CE estima el RCS debido al incremento en la concentración de iones (K, Na, Cl, Mg) en la leche; los cuales se infiltran a la glándula mamaria desde la circulación, durante la respuesta inflamatoria (Viguier *et al.*, 2009; Brandt *et al.*, 2010). La CE es la medida de la conductancia que tiene un material a una corriente eléctrica (Nielen *et al.*, 1992). Al aumentar las concentraciones de aniones y cationes en la leche, aumentará la conductancia y por ende aumentará la CE. Se ha determinado que el rango normal de CE en leche bovina es de 4 a 5.5

mili-Siemen/cm (Norberg *et al.*, 2004). Fosgate y colaboradores (2013), observaron que la herramienta del CMT fue más confiable que la CE para clasificar animales que presentaron  $RCS > 200 \times 10^3 \text{ cél.ml}^{-1}$ . En dicho estudio se reportó una sensibilidad de 94.5% vs 89% y especificidad de 77.7% vs 89% para la prueba de CMT vs CE, respectivamente. La prueba de CE es ampliamente adoptada debido a que los sistemas de ordeño pueden medir cambios en CE ya que tienen incorporados electrodos para medir la misma durante la rutina de ordeño (Norberg *et al.*, 2004). Sin embargo se ha observado que el equipo de ordeño requiere múltiples sincronizaciones al año. En adición variaciones en la CE no relacionadas con mastitis pueden presentar problemas de diagnóstico (Viguiet *et al.*, 2009).

Otra prueba de campo es el DeLaval (**DCC**, por sus siglas en inglés), el cual está equipado con un contador celular óptico portable con tecnología de fluorescencia óptica (Viguiet *et al.*, 2009). Este equipo utiliza un casete desechable en el cual se coloca una muestra de 1  $\mu\text{L}$ . La leche se mezcla por presión capilar dentro de la cámara del casete, el cual contiene pequeñas cantidades de yoduro de propidio utilizado como marcador específico fluorescente para teñir el ADN nuclear de las células somáticas (Hunt *et al.*, 2012). El casete contiene una ventana de conteo la cual es expuesta a una fuente de luz. Cuando el ADN teñido es activado por una fuente diodo emisor de luz (**LED**) que emite un largo de luz específica el cual es captado por un sistema óptico integrado. El sistema toma la imagen del núcleo teñido de cada célula somática, generando en menos de dos minutos el RCS de la muestra; expresada en células. $\mu\text{L}^{-1}$  de leche (Nelson, 2004; Gonzalo *et al.*, 2006; Spanu, 2010). El DCC tiene la ventaja de ser un instrumento que es portátil, fácil de usar y se puede utilizar directamente en el campo (Nelson, 2004; Gonzalo *et al.*, 2006; Viguiet *et al.*, 2009). Se han determinado los valores de correlación que tiene el DCC comparado con el método microscópico para determinar RCS en muestras de leche en ganado

lechero bovino, teniendo una correlación de 0.98 (Hanuš *et al.*, 2011) y 0.99 en ovinos (Gonzalo *et al.*, 2006). Nelson (2004), mencionó que el DCC comparado con otras herramientas (ej. Fossomatic) tiene una buena correlación  $r > 0.88$ . En adición, menciona que la distribución de los valores analizados por el DCC fue aceptable, ya que presentó menos de 1% de datos inciertos o incorrectos. Sin embargo, cabe recalcar que la principal desventaja que presenta el DCC es su elevado costo \$3,000 – 4,000 (Viguiet *et al.*, 2009).

Una técnica relativamente nueva que está siendo utilizada para determinar el RCS es el microscopio portable para contar células somáticas con un “chip” desechable (**C-reader**) (Moon *et al.*, 2007). El C-reader es un sistema en el cual un “chip” desechable, incorporando una técnica de micro-fluidos, absorbe por capilaridad 20 $\mu$ L de leche con soluciones de tinción (incluidas en el “chip”). Esta solución consta de solución buffer fosfatada (**PBS**) al 0.1 M con pH 5.8, un detergente Triton-X 100 al 2 % para la destrucción de las células y un tinte fluorescente de bromuro de etidio. Una vez la muestra de leche es colectada con el “chip” este es colocado sobre un sistema óptico de un microscopio invertido (Digital Bio Technologyco., Seoul, Korea), luz LED verde (520nm) activa la fluorescencia de la muestra en el chip, la cual es captada y escaneada por una cámara con un lente de enfoque de 4x. Luego un “software” (programa de computadora) analiza la imagen de la muestra y la concentración de los RCS son presentados en una pantalla. Este sistema consta de un equipo de 17 kg que tiene una batería acoplada, lo que le permite ser una herramienta a utilizar a nivel de campo (Moon *et al.*, 2007). Investigaciones realizados por Moon y colaboradores (2007), demostraron la alta correlación ( $r = 0.935$  a  $0.964$ ) que presenta el C-reader comparado con otros equipos comerciales para determinar el RCS a nivel de laboratorio (Fossomatic 4000, Somacount 150 y Somacope). El C-reader es una herramienta nueva, fácil de usar a nivel campo o laboratorio y automática que puede determinar

valores de RCS confiables y con aceptable repetitividad (Moon *et al.*, 2007). La desventaja que puede presentar este equipo es su relativo alto costo.

Existen diferentes equipos y métodos para determinar mastitis mediante el RCS a nivel de laboratorio. El método que se ha utilizado como referencia para determinar el RCS es el de microscopio directo. Este método utiliza el tinte de azul de metileno para teñir las células somáticas y a través del microscopio se van contabilizando una por una (U.S. Department of Health and Drug Administration, 2005). Sin embargo este método requiere de personal entrenado para obtener resultados confiables (Moon *et al.*, 2007). Otro método para determinar el RCS es utilizando el conteo de partículas electrónicas. Este utiliza una solución de formaldehído para fijar las células somáticas y una solución para romper las partículas de grasa. Posteriormente se cuentan las partículas resultantes (correspondientes a las células somáticas) (Miller *et al.*, 1986; International Federation Dairy, 1995). El método mayormente utilizado para determinar el RCS a nivel de laboratorio es el método óptico de células fluorescentes utilizando los principios de citometría de disco (Fossomatic 90) y citometría de flujo (Fossomatic 5000, Somacount 150 y Somascope). El principio de citometría de flujo consiste en re-suspender células teñidas con colorantes fluorescentes (bromuro de etidio), a través de un tubo capilar por el cual pasa solo una célula. El tubo se encuentra al frente de un microscopio objetivo el cual es iluminado con una luz láser azul que activa las células teñidas. Estas a la vez emiten luz roja la cual es captada por foto receptores con filtros específicos del microscopio. La magnitud de luz roja captada se multiplica por un factor definido de trabajo (fotoreceptores) y de esta manera se determina el RCS según la producción de impulsos fluorescentes. En el caso de la citometría de disco, el foto-receptor cuenta el número de células que pasan al microscopio sobre un disco giratorio (Gunasekera, 2003; Gonzalo *et al.*, 2004, 2006; Moon *et al.*, 2007; Galanzha y Zharov, 2012). Estas técnicas

han presentado valores confiables para determinar el RCS. Por ejemplo Nelson (2004); Hanuš y colaboradores (2011); Gonzalo y colaboradores(2006) encontraron un valor de correlación mayor a 0.90 entre la determinación de RCS por los métodos fluorescentes ópticos y por microscopio. La principal desventaja que presenta esta metodología es que no se puede utilizar a nivel de campo debido a la complejidad del equipo. En adición, su costo de inversión es muy alto y para sincronizar estos equipos es necesario tener muestras estándar que se han determinado con el método directo de microscopio (Gonzalo *et al.*, 2006).

Las técnicas mayormente utilizadas actualmente por los ganaderos y veterinarios para detectar mastitis en fases tempranas a nivel de campo presentan ciertos inconvenientes. Por ejemplo, el CMT es muy subjetivo, el PORScC presenta baja sensibilidad a bajo RCS, la CE es demasiado variable y requiere sincronización del equipo en varios intervalos al año y el DCC, y el C-reader son relativamente costosos (Viguiet *et al.*, 2009). Por tal razón una alternativa para la detección temprana de mastitis es el uso de la termografía infrarroja (**TIR**) (Berry *et al.*, 2003; Colak *et al.*, 2008; Polat *et al.*, 2010; Curbelo-Rodríguez, 2011). Esto debido a que al existir una infección se va a desencadenar una respuesta inflamatoria la cual resultará en un aumento de temperatura en el área afectada. Al ser una infección local a nivel de la glándula mamaria, el aumento en temperatura podría ser evaluado en la leche y mientras mayor sea la infección, mayor será la respuesta inflamatoria con un posible aumento en la temperatura de la leche.

## 2.10 Termografía infrarroja

La TIR se basa en la medición de la radiación infrarroja que es emitida por todo objeto (origen biológico o no biológico) que tenga una temperatura sobre cero absoluto (0°K ) (Tan *et al.*, 2009; Bagavathiappan *et al.*, 2013). La TIR es un método no invasivo y seguro que permite obtener la estimación del perfil térmico del objeto de interés, debido a que todo objeto produce

energía proporcional a su temperatura (Colak *et al.*, 2008; Polat *et al.*, 2010; FLIR, 2014). En adición, esta energía producida se puede perder en forma de calor por conducción, radiación y convección. (Colak *et al.*, 2008).

La TIR captura la radiación emitida por la colisión de moléculas que componen cada material, la cual va a ser proporcional a la temperatura del material. Cámaras con tecnología infrarroja detectan la radiación en el espectro de banda infrarroja de 9,000 a 14,000 nanómetros del espectro electromagnético, transformándola en una imagen visible denominada termograma (Madruga *et al.*, 2010; Lee *et al.*, 2011; Alsaad y Büscher, 2012). La temperatura del objeto es calculada y brindada directamente por la cámara en °C o °F, a partir de la intensidad de radiación emitida utilizando la ley de Stefan-Boltzman.

$$\frac{q}{A} = \varepsilon\sigma T^4.$$

Donde  $q$  es la amplitud de valores de energía emitida,  $A$  es el área de la superficie ( $m^2$ ),  $T$  es la temperatura absoluta en °K,  $\sigma$  es la constante de Stefan-Boltzman y  $\varepsilon$  es la emisividad del objeto o superficie. Mientras mayor sea la radiación mayor será la temperatura (Bagavathiappan *et al.*, 2013; Lahiri *et al.*, 2014).

La TIR hace uso de un sistema de elementos ópticos y electrónicos compuestos de un lente que enfoca radiación infrarroja sobre un detector en forma de matriz plano focal (**MPF**) y un “software” para procesar la radiación infrarroja a pixeles (FLIR, 2014). La conversión de la radiación infrarroja a una imagen visible es el paso más crítico, debido a que es necesario que esta conversión se realice lo más rápido posible para evitar variaciones entre la temperatura del objeto al momento de la toma y la temperatura en la imagen ya procesada (Astrov *et al.*, 2009). Esta conversión va a depender del detector de la cámara infrarroja, el cual es una MPF que contiene elementos sensibles de tamaño micrométrico formado por varios materiales sensitivos a

diferentes longitudes de onda. La cantidad de elementos sensitivos va a depender de los pixeles de la cámara, existen cámaras que van desde 160 x 120 hasta 1024 x 1024 pixeles (Rogalski, 2011). Los elementos sensitivos de la MPF convierten la radiación infrarroja a tensión eléctrica, debido a que la radiación infrarroja altera la resistencia de los elementos sensitivos (Tan *et al.*, 2009; FLIR, 2014).

Los detectores de MPF se han dividido en detectores termales (no cuánticos) y detectores cuánticos (Rogalski, 2011; FLIR, 2014). Los detectores termales son microbolómetros, piroeléctricos y células de Golay, los cuales detectan el calor generado por medio de la radiación infrarroja, no son dependientes del largo de onda y son los que mayormente se emplean debido a su bajo costo y su alta sensibilidad (Tan *et al.*, 2009; Topaloglu *et al.*, 2013). Los microbolómetros son el tipo de elementos detectores que utiliza la cámara FLIR e-50. Estos pueden ser utilizados a temperatura ambiente y no necesitan un sistema de enfriamiento, lo que los hace disponibles para muchas aplicaciones, especialmente biológicas (Kim y Han, 2001). Los detectores termales trabajan bajo el principio termoeléctrico. Los elementos sensibles que contiene la MPF están formados por unas láminas rectangulares con una conocida capacidad de resistencia a calor, al alterarse esta resistencia se produce un impulso eléctrico. Los detectores termales del tipo bolómetro trabajan a manera que registran diferencias en temperaturas, que se generan a partir de la variación en la resistencia del elemento sensible (Astarita y Carlomagno, 2012). Los detectores cuánticos o detectores fotónicos tienen un sistema de operación basado en el cambio de estado de un electrón, integrados a una plataforma estructural (*e.g.*, cristal, silicón, entre otras), la cual reacciona a la incidencia de los fotones; es decir son dependientes del largo de onda (Tan *et al.*, 2009; Antonelli *et al.*, 2013). Los detectores cuánticos pueden detectar la temperatura de la superficie de objetos pequeños o de materiales a bajas temperaturas ya que los

elementos detectores necesitan una baja temperatura para activar el electrón y requieren sistema de enfriamiento para procesar las imágenes.

Las imágenes digitales se forman gracias a los elementos sensibles debido a que cada uno es un pixel, entonces al alterarse cada elemento sensitivo este producirá un impulso eléctrico o cambio de electrón que será capturado por el elemento detector y generará un pixel con diferente temperatura. Una vez ya procesadas las imágenes, estas ofrecen diferentes gradientes de colores que reflejan las diferencias en temperaturas capturadas (Eddy *et al.*, 2001).

Se debe tomar en cuenta que la radiación infrarroja medida por la cámara TIR depende de la temperatura del objeto, emisividad que tenga el mismo, su reflectividad y la del entorno (Kunc *et al.*, 2007). La emisividad del objeto es la habilidad que tiene un objeto de emitir radiación infrarroja perteneciente al mismo, mientras que la reflectividad es la habilidad de un objeto en reflejar esta radiación (Eddy *et al.*, 2001). Para obtener una medida confiable de temperatura se tiene que tener en cuenta los factores que influyen la radiación. Por tal razón la TIR puede estimar muchos factores como son: emisividad del objeto, la reflectividad, la distancia entre el objeto y la cámara, la humedad relativa y la temperatura ambiental.

#### 2.11 Uso de sistemas de termografía infrarroja para evaluar el perfil térmico de los animales domésticos

En los animales homeotérmicos la temperatura corporal es relativamente estable debido a los procesos biológicos de termorregulación que estos poseen (Aggarwal y Upadhyay, 2013). Cuando se está expuesto a un ambiente que sobrepasa la amplitud de valores de temperatura de la zona termo neutral del animal es decir la zona de confort térmico, la vasodilatación es un mecanismo utilizado para eliminar calor en exceso y mantener una temperatura estable (Wheeler, 2006). Esta respuesta es controlada por el sistema nervioso simpático al regular la tasa de dilatación de los vasos periféricos, aumentando el flujo de sangre hacia la periferia, facilitando

una mayor pérdida de temperatura por los mecanismos de disipación de calor que el organismo emplea (*e.g.* convección, conducción y radiación) hacia el ambiente (Kadzere *et al.*, 2002; Wilkins y Wheeler, 2004). Otro mecanismo para eliminar calor es la evapotranspiración. Este mecanismo está gobernado por las fibras colinérgicas post-ganglionares simpáticas, las cuales estimulan las glándulas sudoríparas a producir secreción merócrina sobre la piel (sudor), generando pérdida de calor por evaporación y disminuyendo la temperatura de la superficie de esta área, (Wilkins y Wheeler, 2004; Wheeler, 2006). En vacas lecheras ocurren dos formas de evapotranspiración, la primera es una sudoración insensible la cual el cuerpo suda constantemente, a menos que la humedad relativa este cerca del 100%. El otro tipo de evapotranspiración es la mecánica cuando el animal suda para crear un enfriamiento por evaporación a causa de un aumento de temperatura (Kadzere *et al.*, 2002).

Cuando se está expuesto a un ambiente frío los mecanismos para conservar calor son controlados por el sistema nervioso simpático (Wheeler, 2006). El flujo de sangre hacia la piel es reducido por lo cual la pérdida de calor es menor. Este proceso es controlado por adrenoreceptores  $\alpha_1$  y adrenoreceptores periféricos  $\alpha_2$  (Zerpa *et al.*, 2010). Estos receptores son responsables de controlar la constricción de venas y arterias principalmente de las extremidades, reduciendo el flujo de sangre hacia la periferia y de esta manera la temperatura corporal profunda se conserve (Wilkins y Wheeler, 2004; Wheeler, 2006; Zerpa *et al.*, 2010). Otros mecanismos para conservar calor son la erección pilosa, escalofrío y actividad voluntaria del músculo; sin embargo estos son ineficientes para la producción de calor (Wilkins y Wheeler, 2004).

Alteraciones en la temperatura corporal profunda de los animales solo ocurren durante episodios extraordinarios incluyendo estrés termal severo, infecciones sistémicas, etc. Varios investigadores han utilizado la TIR para evaluar el perfil térmico en animales (Hurnik *et al.*,

1984; Schaefer *et al.*, 2004; Kunc *et al.*, 2007; Mccafferty, 2007; Hovinen *et al.*, 2008; Aljumaah *et al.*, 2012; Alsaad y Büscher, 2012). Nikkhah y colaboradores (2005) evaluaron la capacidad de la TIR para evaluar la temperatura en las patas de vacas lecheras en diferentes estados de lactación, reportando que animales con < 200 (n=17) días en leche presentaron un promedio menor temperatura en la banda coronaria comparado con animales > 200 días en leche (n=17) (25.4±1.3 vs 21±1.5°C). En adición, el incremento de temperatura en la banda coronaria coincide con un aumento de hemorragia en las patas. Por lo tanto, es posible que el uso de TIR para medir la temperatura de la pezuña, se utilice para detectar inflamaciones asociadas con laminitis. En otro estudio, Alsaad y Büscher (2012) reportaron un aumento en temperatura de la banda coronaria de animales con lesiones comparado, con vacas que no presentaban lesiones. Rainwater-Lovett y colaboradores (2009), utilizaron la TIR para evaluar cambios en temperatura de las patas durante diferentes estados de infección a causa del virus de la fiebre aftosa, en animales inoculados con el virus directamente (n=12) y animales que entraron en contacto con los infectados (n=6), durante el estadio pre-clínico la amplitud de calores de temperatura de las patas fue de 31.8 a 37.1°C y 31.4 a 38.1°C, respectivamente; para el estado pos-clínico la amplitud de rango de temperatura de las patas fue 37.3 a 40.1°C y 31.6 a 39.5°C, respectivamente. En adición estos autores concluyen que el uso de TIR, es una herramienta no invasiva y confiable para evaluar varios animales. En otra investigación Curbelo-Rodríguez (2011), detectó diferencias en temperatura de la superficie de la piel de cuartos infectados vs no infectados en modelos de mastitis *in vivo*. Polat y colaboradores (2010), evaluaron la confiabilidad de la TIR para detectar mastitis sub-clínica usando como objetivo de imagen la glándula mamaria. Estos reportaron sensibilidad, especificidad y valores predichos positivos de 95.6, 93.6 y 95.0 % respectivamente. El uso de la TIR ha presentado resultados prometedores, en

modelos de mastitis experimentalmente inoculados con LPS de *Escherichia coli* (10 µg), detectando diferencias de 1 a 1.5°C en la temperatura de la ubre. En adición, se ha reportado una correlación lineal  $r = 0.92$  ( $P = 0.001$ ) entre la temperatura rectal y la temperatura de la superficie de la ubre infectada (Hovinem *et al.*, 2008). En otra investigación, Metzner *et al.* (2014), utilizando la TIR compararon la temperatura de cuartos mamarios pre y pos inoculación con *Escherichia coli*. Estos observaron que los promedios de temperatura de la superficie de los cuartos mamarios infectados vs no infectados presentaron diferencias significativas de 36.93 vs 35.70°C respectivamente. En adición determinaron que la mejor manera para analizar las imágenes termográficas (IT) era por medio del uso de polígonos en el cuarto mamario. Martins y colaboradores (2012) en un estudio realizado utilizando ovejas, observaron diferencias marcadas en la temperatura máxima de la ubre comparando entre una infección de mastitis de tipo clínica (38.4°C) y sub-clínica (39.02°C). Según Hoffmann y colaboradores (2013) la TIR es una herramienta confiable ya que puede estimar de una forma rápida el estado de salud del animal.

Los autores mencionados anteriormente concluyen que el uso de la tecnología infrarroja podría ser empleado como una herramienta práctica para determinar la temperatura de la ubre con una alta habilidad predictiva. Sin embargo, en los estudios mencionados anteriormente, para la colección de imágenes se requirió aclimatizar a los animal previo a la toma de imágenes, moviendo los animales a un cuarto oscuro con una temperatura constante para evitar influenciar la temperatura de los mismos a causa de radiación solar, humedad y velocidad del viento (Polat *et al.*, 2010).

## 2.12 Factores que influyen la temperatura de la ubre

Investigaciones han demostrado que el ganado lechero vacuno presenta variaciones en su temperatura corporal debido a fluctuaciones en el ritmo cardiaco (Bitman *et al.*, 1984); por lo que

teóricamente estas fluctuaciones podrían afectar la temperatura de la ubre (Berry *et al.*, 2003). Bitman *et al.* (1984) reportó que 4 de 6 vacas después de un periodo de ejercicio presentaron un aumento de 1.25°C en la temperatura de la ubre. En adición, Berry *et al.* (2003) utilizando 10 vacas Holstein reportó diferencias significativas en la temperatura de la ubre antes y después de un periodo de ejercicio, con promedios de 33.42 y 34.46°C respectivamente. En estos estudios el aumento a exposición a calor por la radiación del sol asociado con la actividad del ejercicio realizado causó que exista ese aumento en temperatura de la ubre (Berry *et al.*, 2003) .

Factores climáticos como la temperatura ambiental, humedad relativa, radiación y velocidad del viento también afectan la temperatura de la superficie de la ubre (Berry *et al.*, 2003; Colak *et al.*, 2008; Polat *et al.*, 2010; Curbelo-Rodríguez, 2011; Metzner *et al.*, 2014). Berry *et al.* (2003) realizaron modelos para predecir la temperatura de la superficie de la ubre, los modelos que presentaron una mejor predicción ( $r = 0.73$  a  $0.93$ ), fueron aquellos en los que se incluyeron los parámetros climáticos (temperatura ambiental y humedad). De esta manera se demostró que los factores climatológicos si alteran la temperatura de la ubre. En otra investigación Castro-Costa *et al.* (2014) reportaron una correlación positiva ( $r = 0.88$ ) entre la temperatura de la superficie de la ubre y la temperatura ambiente.

En adición, al llevar a cabo la TIR otros factores pueden contaminar la superficie de interés como son: agua, heces, materia orgánica y orina. Estos alteran la temperatura de la superficie de la ubre causando que esta no sea el mejor objetivo para realizar la detección de cambios en temperatura asociados al proceso inflamatorio a nivel de campo (Berry *et al.*, 2003; Colak *et al.*, 2008; Polat *et al.*, 2010; Curbelo-Rodríguez, 2011; Metzner *et al.*, 2014). Además, desde un punto de vista más práctico, el utilizar la ubre como objeto de imagen para obtener imágenes termográficas de los cuatro cuartos individuales podría presentar algunos

inconvenientes de manejo. Debido a que se requieren de varias imágenes y sujetar la cola del animal para poder tomar la imagen de los cuartos posteriores (Colak *et al.*, 2008; Curbelo-Rodríguez, 2011; Metzner *et al.*, 2014). En adición realizar un periodo de pre-a climatización para los animales en un cuarto oscuro a una temperatura constante (Polat *et al.*, 2010). Pezeshki y colaboradores (2011) reportaron que el uso de la TIR resulta una herramienta útil para detectar cambios en temperatura en la superficie de la ubre (2 a 3 °C) entre animales sanos e infectados con *Escherichia coli*. Sin embargo, la máxima temperatura de la superficie de la ubre ocurrió después que el animal presentó un pico de temperatura rectal y presencia de signos locales.

Según las razones expuestas anteriormente, el uso de la TIR como herramienta para la detección temprana de mastitis a nivel de campo, utilizando como enfoque de imagen la superficie de ubre posee varias limitaciones. Por tales razones se sugiere utilizar como objetivo de toma de imagen una superficie la cual no sea susceptible a factores que puedan alterar su temperatura y que a la misma vez permita obtener información termográfica de los cuatro cuartos individuales simultáneamente.

### 2.13 Temperatura de la leche como evaluador de estado de salud de la glándula mamaria

Según West y colaboradores (2003) la temperatura de la leche es un excelente indicador de la temperatura corporal, debido al alto grado de vascularidad que glándula mamaria posee. Bitman y colaboradores (1984), usando termistores introducidos en la ubre y en la cavidad peritoneal de vacas lactantes demostraron que existe una alta correlación ( $r = 0.98$  a  $0.99$ ) entre la temperatura de la ubre y la temperatura corporal ( $38.88 \pm 1.25$  y  $38.81 \pm 1.27^{\circ}\text{C}$ , respectivamente). Igono y colaboradores (1987), reportaron una correlación de 0.89 entre la temperatura de la leche y la temperatura rectal. Sin embargo, West *et al.* (2003) reportaron que los factores climáticos que afectan la temperatura de la leche son la temperatura ambiental

mínima y el promedio de la temperatura ambiente durante el ordeño de la mañana y la tarde, respectivamente.

Existen factores ambientales y fisiológicos que pudieren alterar la temperatura de la leche (McArthur *et al.*, 1992; West *et al.*, 1999, 2003; Suthar *et al.*, 2011). Suthar y colaboradores (2011) describen que uno de los factores fisiológicos asociados con alteraciones en la temperatura de los animales es el estado reproductivo (*i.g.*, estro/celo). Estos autores determinaron que la temperatura vaginal durante el estro aumenta hasta 39.00°C. Sin embargo, McArthur y colaboradores (1992), reportan que la temperatura de la leche no se ve afectada por el estado reproductivo del animal. Otro factor fisiológico que pudiera alterar la temperatura de la leche son las infecciones. Las infecciones no relacionadas a mastitis pueden generar una respuesta inflamatoria del tipo sistémico, causando varias injurias clínicas severas como aumento de temperatura (fiebre), aumento del ritmo cardiaco y aumento en la tasa respiratoria (Nyström, 1998). Por otra parte cuando la infección llega al torrente sanguíneo (septicemia), hay una sobreproducción del factor c5a (Hezmee *et al.*, 2012). Como consecuencia en el torrente sanguíneo, una segunda reacción inflamatoria es producida, debido a la producción de citoquinas. Al existir un exceso de factor c5a la función bactericida de los neutrófilos es deficiente (Guo y Ward, 2005) y las altas concentraciones de PGE<sub>2</sub> podrían causar el desarrollo de fiebre (Stevens *et al.*, 2012). Por lo mencionado anteriormente la respuesta inflamatoria sistémica y la septicemia, generan un aumento en la temperatura corporal que pudiera afectar la temperatura de la leche. Lo mencionado anteriormente fue confirmado por Wenz y colaboradores (2011) donde determinaron que la temperatura rectal de los animales que presentaron infecciones sistémicas (n=177) fue de 39.20 ± 0.73°C mientras que la temperatura de animales saludables (n=197) fue de 38.7 ± 0.03°C. Sin embargo, infecciones locales como la mastitis han sido

reportadas en alterar la temperatura de la ubre desde el desarrollo inicial de la infección y por ende pudiera alterar la temperatura de la leche, ya que este tipo de infección afecta directamente el sistema vascular de la glándula mamaria. En investigaciones usando la TIR para detectar mastitis Colak y colaboradores (2008) observaron que cuando el animal presentó un resultado negativo para CMT la temperatura de la ubre fue de 33.19°C. Sin embargo, cuando presentó un resultado de 3 en la prueba de CMT, la temperatura de la ubre fue de 36.15°C. Polat y colaboradores (2010), determinaron que al aumentar el RCS en la leche ocurre un aumento en la temperatura de la ubre, por ejemplo cuando se compararon un RCS de  $65 \times 10^3$  vs  $3,653 \times 10^3$  cél.ml<sup>-1</sup>, la temperatura de ubre fue de  $33.23 \pm 0.09$  vs  $36.27 \pm 0.07$ °C, respectivamente. Como se mencionó anteriormente los factores climáticos, ambientales y/o fisiológicos pueden afectar la temperatura corporal del animal y, por ende, la temperatura de la leche. Sin embargo, la mastitis al afectar directamente al tejido mamario, genera un aumento en la temperatura de la superficie de la ubre y por ende la temperatura de la leche podría presentar también un aumento.

Por las razones expuestas anteriormente, el perfil térmico de la leche puede ser un buen indicador del estado de salud de la glándula mamaria. Las IT de muestras de leche antes del proceso de ordeño podrían ser usadas para estimar el RCS. Además, IT de componentes de la unidad de ordeño que tengan contacto directo con la leche incluyendo tubos cortos de leche, colector de leche y/o manga de leche, podrían usarse para determinar la temperatura de la leche. Sin embargo hay que tomar en cuenta que existen posibles factores que pueden influenciar la temperatura de estos. Estos factores pueden ser, el vacío que produce el equipo de ordeño, el flujo de leche a través del tubo corto. Fordham *et al.* (1987) el lugar donde existe menos variaciones en la medición de temperatura es en los tubos cortos y en el colector de la máquina de ordeño. Además reportó que existe una mayor diferencia en la temperatura de la leche cuando el flujo de

ordeño tuvo un promedio  $< 1.37 \text{ kg}\cdot\text{min}^{-1}$  y/o el rendimiento de leche promedio era  $< 7.82 \text{ kg}\cdot\text{ordeño}^{-1}$ . Tomando en cuenta estos factores, se podría usar la temperatura de la leche como indicador de mastitis. En adición, usar la TIR para determinar la temperatura de la leche, y utilizarla (TIR) como una herramienta de diagnóstico más rápida a nivel de campo y así poder estimar el estado de salud de la glándula mamaria relativo a otras pruebas a nivel de campo incluyendo CMT, CE y DCC.

### 3 TERMOGRAFÍA INFRARROJA PARA LA DETECCIÓN DE MASTITIS EN MUESTRAS DE LECHE

#### 3.1 Introducción

La mastitis se define como la inflamación de la glándula mamaria en respuesta a: infecciones causadas por patógenos (comúnmente de origen bacteriano) o a inflamaciones generadas por traumas/irritación (Bradley, 2002; Zhao y Lacasse, 2008). La mastitis sub-clínica es la que genera más pérdidas debido a que es difícil de detectar, disminuye la producción de leche y aumenta los costos de la producción (Ott, 1999). La mastitis sub-clínica no muestra síntomas asociados al proceso de infección. Sin embargo, si hay cambios composicionales de la leche (*e.g.*, aumento de células inmunes, pH y conductividad), afectando la calidad de la leche (Plastridge, 1958; Harmon, 1994). Actualmente el consumidor y el procesador desean una leche de calidad para de esta manera obtener productos seguros y tener una producción estándar de derivados lácteos (Dong *et al.*, 2012). Para obtener una leche de calidad existen algunos factores que se deben tener en cuenta, entre estos el residuo de antibióticos mastíticos y un elevado recuento de células somáticas (**RCS**) en la leche. Por tal razón, se ha establecido que el límite máximo de RCS en la leche del tanque que puede tener un productor en Puerto Rico es de  $750 \times 10^3$  cél.ml<sup>-1</sup> de leche (U.S. Department of Health and Drug Administración, 2011). Por lo mencionado anteriormente se debe establecer un plan para la prevención y control de mastitis. Para esto se han desarrollado técnicas o pruebas a nivel de campo para evaluar el estado de salud de la glándula mamaria tales como: la prueba de mastitis californiana (**CMT**, por sus siglas en inglés), el DeLaval (**DCC**, por sus siglas en inglés), C-reader, el estimador portable de células somáticas (**PORScc**) y la conductividad eléctrica (**CE**). Sin embargo, se ha observado que estas técnicas son subjetivas, presentan altos costos, tienen baja sensibilidad y variabilidad, respectivamente (Viguiet *et al.*, 2009). Debido a los problemas que se han encontrado en estas

técnicas de detección de mastitis a nivel de campo, se están desarrollando nuevas pruebas que sean capaces de detectar problemas de mastitis sub-clínica en etapas tempranas y de esta manera mejorar la salud del hato y la calidad de la leche. Una alternativa para la detección temprana de mastitis es el uso de termografía infrarroja (**TIR**) (Berry *et al.*, 2003; Colak *et al.*, 2008; Polat *et al.*, 2010). La TIR es una técnica moderna, no invasiva y segura que permite obtener la estimación del perfil térmico. Debido al proceso de inflamación durante el desarrollo de mastitis, la TIR se podría utilizar para detectar cambios en temperatura de la leche durante el proceso inicial del establecimiento de mastitis. Varios investigadores (Colak *et al.*, 2008; Hovinen *et al.*, 2008; Polat *et al.*, 2010; Curbelo-Rodríguez, 2011) han usado la TIR para detectar mastitis utilizando como objetivo de imagen de la superficie de la ubre. Sin embargo, este método presenta varios problemas asociados con factores climáticos y de manejo, por lo cual se recomienda utilizar otro objetivo para tomar las imágenes termográficas (**IT**) para detectar mastitis (Colak *et al.*, 2008; Polat *et al.*, 2010). La mastitis al ser una inflamación a nivel glándula mamaria, esta provoca un aumento en temperatura en esa área. La temperatura de la leche también podría aumentar y esta se podría utilizar para detectar dichos cambios en temperatura a causa de la inflamación producida por la infección. De esta manera, el perfil térmico de muestras de leche se podría utilizar como objetivo para tomar la IT y evaluar los parámetros predictivos para detectar mastitis, relativo a otras técnicas como CMT, DCC y CE.

### 3.2 Objetivos

- Validar el uso de termografía infrarroja en muestras de leche como predictores de temperatura a nivel de campo.
- Evaluar parámetros predictivos de diagnóstico de la termografía infrarroja en muestras de leche como herramienta de detección de mastitis.
- Determinar un posible modelo predictivo para determinar el contenido de células somáticas a partir de la temperatura de muestras de leche, tomando en cuenta otros factores (climáticos, bacteriológicos, entre otros) que pudieran alterar la temperatura de la leche.

### 3.3 Materiales y Métodos

#### 3.3.1 Descripción del lugar

La investigación fue conducida en un hato lechero comercial de Puerto Rico ubicado en Lajas (Latitud: 18° 01'55" N, Longitud 67° 04'18" O, con una elevación de 26 metros sobre el nivel del mar). Las condiciones climáticas del área durante el periodo de estudio fueron: temperatura ambiental 25.76°C, HR 71.01%, velocidad del viento 0.3 m/s.

#### 3.3.2 Categorización de cuartos individuales

Se utilizaron 142 cuartos mamarios categorizados en 3 grupos de acuerdo al RCS. Bajo <math>200 \times 10^3 \text{ cél.ml}^{-1}</math>, intermedio  $\geq 200 \times 10^3$  a  $\leq 750 \times 10^3 \text{ cél.ml}^{-1}$  y alto  $> 750 \times 10^3 \text{ cél.ml}^{-1}$  en leche. Previo al día de prueba, se realizó una pre-categorización de los cuartos mamarios estimando el RCS utilizando los valores de CE por animal del ordeño anterior, ofrecidos por el equipo de ordeño de la vaquería asociada al estudio (Afimilk Ltd., Kibbutz Afikim, Israel). Según los valores de CE, se pre-seleccionaron los animales a muestrear durante el día de prueba.

#### 3.3.3 Parámetros climatológicos evaluados

48 horas antes y durante los días de pruebas se evaluaron los parámetros climatológicos que influyen la temperatura de las IT como son: temperatura ambiental y humedad relativa en la sala de ordeño y de espera. Las variables se determinaron con un U23-01 HOBO TEMPERATURA/HR Logger (Onset®; Massachusetts, USA); (Anejo 1A) en intervalos de 10 minutos. La velocidad del viento se midió con un anemómetro (Thermo Fisher Scientific Inc.; Massachusetts, USA); (Anejo 1B) en intervalos de 10 minutos, solo durante el día de prueba.

Previo a la toma de IT, cada día de prueba se registraron los valores de temperatura ambiental y humedad actual de la sala de ordeño con un anemómetro para calibrar la cámara termográfica a las condiciones ambientales del día de prueba. Para determinar la temperatura

reflejada (reflectividad) de la sala de ordeño, se utilizó un pedazo de papel de aluminio arrugado, debido a que este material refleja hasta un 98% de la energía infrarroja del ambiente. Este se colocó en el mismo lugar donde se realizó la toma de IT. Se ajustó el parámetro de emisividad de la cámara termográfica a 1 para contabilizar la reflectividad correspondiente al papel de aluminio con la cámara termográfica. Posteriormente, se procedió a registrar la temperatura promedio del papel de aluminio con la cámara termográfica (Anejo 2A) y esta se utilizó como la temperatura reflejada del área de la sala de ordeño.

Para calcular la emisividad de las muestras de leche, se midió la temperatura de la leche utilizando una paleta de CMT modificada (Anejo 3B). Esta estaba equipada con una sonda termal HYP2-21-1//2-T-G-48-OSTW-M (OMEGA Engineering Inc.; Connecticut, USA) conectada al termómetro de 4 canales HH147U almacenador de datos (OMEGA Engineering Inc.; Connecticut, USA); (Anejo 1D). El valor de la temperatura de la leche, se utilizó como referencia para ajustar el valor de emisividad de la cámara (Anejo 2B).

### 3.3.4 Evaluación de síntomas o signos de mastitis

Previo a la colección de muestras de leche, cada cuarto mamario de los animales seleccionados fue evaluado visualmente durante la preparación de la ubre para determinar casos clínicos de la mastitis. Para esto, cada cuarto se observó y se palpó para evaluar temperatura, firmeza o enrojecimiento. Posteriormente, se colocó solución desinfectante (Whisper<sup>TM</sup> V, Ecolab) previo a sacar la primera porción de leche (4-5 chorros) en un recipiente con un embudo de fondo negro y se observó signos de dolor y/o presencia de coágulos grumos o aspecto anormal de la leche. Posteriormente se procedió a limpiar los pezones con una toalla de tela individual por vaca.

### 3.3.5 Toma de muestras asépticas de leche

Una vez evaluados los signos o síntomas de mastitis, se procedió a tomar una muestra aséptica de leche (10 ml) de los cuartos experimentales seleccionados (antes de ordeñar) (Anejo 6A), siguiendo las recomendaciones del “*Microbiological Procedures for the Diagnosis of Bovine Udder Infection and Determination of Milk Quality*” (2004). En resumen, los pezones de los cuartos mamarios seleccionados se desinfectaron con un papel toalla empapado en alcohol etílico al 70% utilizando guantes de nitrilo (Thermo Fisher Scientific Inc.; *Massachusetts*, USA). Luego se removió la tapa del tubo estéril falcon de 15 ml (Thermo Fisher Scientific Inc.; *Massachusetts*, USA) y se colectó la muestra de leche usando dos dedos para evitar contaminación de la muestra. La muestra fue debidamente identificada con: a) número de la vaca, b) cuarto mamario y c) fecha de toma de muestra. Finalmente cada muestra de leche fue almacenada en hielo y se mantuvo la muestra aproximadamente a 4°C durante un periodo no mayor a 48 horas (Anejo 6B). Las muestras fueron enviadas al laboratorio de calidad de leche privado (Capaez, Hatillo, Puerto Rico) para obtener identificación y número de unidades formadoras de colonias (UFC) de patógenos.

### 3.3.6 Toma de imágenes termográficas de muestras de leche

Una vez limpios los pezones, se realizó la toma de muestras de leche de cada cuarto mamario durante el proceso de preparación de la ubre. Se procedió a coleccionar la muestra de leche de cada uno de los cuartos en la paleta de CMT modificada. Inmediatamente se procedió a tomar una IT a las muestras de leche con la cámara FLIR modelo e-50 (FLIR Systems, Inc.; Oregon, USA) (Anejo 3A), a una distancia de 0.6 metros del objetivo (paleta CMT modificada). Simultáneamente se registró la temperatura de las muestras de leche con la paleta de CMT

modificada (Anejo 3C). A la vez, se colocó la unidad de ordeño, dentro de un periodo no mayor a 2 minutos desde que se inició la preparación de la ubre.

### 3.3.7 Prueba de mastitis californiana de muestras de leche

Inmediatamente luego de tomar la IT de las muestras se tomó una sub-muestra (5 mL de leche/copa) con una pipeta semi-automática de 5 mL (KrackelerScientific, Inc; Albany, USA). Posteriormente se colocó la sub-muestra en una paleta de CMT normal para realizar la prueba de CMT (Anejo 4) y finalmente se registró los resultados.

### 3.3.8 Determinación del recuento de células somáticas en cuartos individuales

Con la leche restante de la paleta de CMT modificada se determinó el RCS exacto por cuarto mamario. Se colectó una sub-muestra de 1  $\mu$ L de leche con el casete, el cual se introdujo en la leche de cada copa de la paleta de CMT (1 casete/copa), para realizar la prueba de DCC y determinar el RCS exacto con el equipo DeLaval Cell Counter (DeLaval, DeLaval International USA, Tumba, Sweden) (Anejo 5). Una vez determinado el RCS exacto ( $< 2$  min), cada cuarto se categorizó apriori en su grupo experimental. Para lograr esto el personal que estuvo realizando la prueba de DCC, análisis termográfico de muestras de leche y CMT fueron diferentes. Esta técnica es conocida como de enmascaramiento de ciego simple. De esta manera se asegura que los resultados de cada una de las pruebas no sean influenciados por conocimiento previo de los resultados.

Una vez que se terminaron de coleccionar los cuartos saludables  $< 200 \times 10^3$  cél.ml<sup>-1</sup> por cuestiones de manejo algunos pasos de la metodología variaron. Hasta la detección de síntomas de mastitis los pasos fueron los mismos a los mencionados anteriormente. Sin embargo, luego se realizó primero una prueba de CMT para estimar cuales era los cuartos mamarios que presentaban RCS  $> 200 \times 10^3$  cél.ml<sup>-1</sup>. Posteriormente se confirmó la cantidad exacta de RCS con

el equipo de DCC, una vez que se sabía específicamente el RCS por cuarto mamario, se seleccionaron solo los necesarios. De los cuartos seleccionados se tomó las muestras asépticas y las IT.

### 3.3.9 Toma de temperatura rectal

Una vez finalizado el proceso de ordeño, se aplicó un sellador (Ster-Bac, Ecolab) y se desinfectaron las unidades de ordeño con agua con yodo. Se tomó la temperatura rectal de las vacas con un termómetro digital GLA Agricultural Electronics modelo 525-550 (con una sonda de acero inoxidable de 11.43 cm de largo) (Anejo 1C).

Cabe recalcar que para la toma de datos se realizó durante la rutina normal de ordeño y solo se utilizó una vaca a la vez.

### 3.3.10 Parámetros predictivos de diagnóstico de imágenes termográficas

Para las variables de termografía infrarroja y para la temperatura de muestras de leche, se definió como un cuarto con mastitis a los valores promedios de temperatura de los cuartos mamarios con  $\geq 200 \times 10^3 \text{cél.ml}^{-1}$  (presencia de mastitis), se definió como un cuarto libre de mastitis a los valores promedios de temperatura de los cuartos con  $\text{RCS} < 200 \times 10^3 \text{cél.ml}^{-1}$  (Dohoo y Leslie, 1991). Los parámetros de diagnóstico predictivo para las variables de termografía infrarroja y para la temperatura de muestras de leche se definen a continuación. Sensibilidad es la proporción entre los cuartos mamarios que presentaron una temperatura mayor a la del punto de corte y los cuartos que presentaron valores  $\geq 200 \times 10^3 \text{cél.ml}^{-1}$ ; es decir la habilidad para detectar casos de mastitis. La especificidad es la proporción entre las muestras que tuvieron una temperatura menor a la del punto de corte y los cuartos que presentaron  $\text{RCS} < 200 \times 10^3 \text{cél.ml}^{-1}$ ; es decir habilidad para no clasificar cuartos saludables como mastíticos. El valor predicho positivo se definió calculando la probabilidad entre los cuartos mamarios con presencia

de mastitis y los cuartos mamarios que tuvieron una temperatura de muestras de leche mayor a las del punto de corte. El valor predicho negativo es la probabilidad entre los cuartos mamarios libres de mastitis y los cuartos mamarios que presentaron una temperatura de muestras de leche menor a las de punto de corte. En adición se calculó los parámetros de diagnóstico predictivo para la prueba de CMT realizada a las muestras de leche, utilizando como punto de corte un valor  $> 0$  en los resultados de CMT ( $> 200 \times 10^3$  cél.ml<sup>-1</sup>) para los cuartos mamarios con presencia de mastitis.

### 3.3.11 Análisis estadístico

Las IT fueron extraídas de la cámara infrarroja para analizarlas en “software” “FLIR Tools versión 4.1.1”. Cada IT de las muestra de leche en la paleta de CMT se analizó de la misma manera y en la misma posición con un círculo de 30 milímetros (**mm**) de diámetro para cada copa de la paleta de CMT (Anejo 9).

Se determinó el tiempo (segundos) transcurrido y la temperatura (°C) que se perdió durante la colección de cada una de las muestras de leche, en la paleta de CMT modificada. De manera que, se colectaron 13 muestras de leche con la paleta de CMT modificada, utilizando la misma metodología descrita anteriormente. Con el “software” “Temp Monitor\_S2 OMEGA” (Engineering Inc.; Connecticut, USA) se obtuvo a tiempo real la temperatura muestras de leche, mientras estas eran colectadas. Una vez extraídos todos los datos se procedió a realizar un promedio de la pérdida de temperatura y de tiempo transcurrido para cada cuarto mamario. Para establecer el promedio del tiempo transcurrido en la toma de muestra de leche, de cada cuarto mamario, se utilizó el valor de cambio en temperatura de la leche. Por lo que, se contó cuantos segundos hubieron desde que se presentó un aumento en temperatura de la leche hasta que, esta llegó al valor más alto. Para determinar la pérdida de temperatura de las muestras de leche, de

cada cuarto mamario, se tomó el valor más alto (temperatura de la leche), se restó el menor valor (temperatura de la leche) y se dividió para el tiempo (segundos) que había entre las temperaturas. Una vez determinados el tiempo transcurrido y la temperatura perdida por cuarto mamario, se procedió a ajustar los valores de las temperaturas en función del tiempo perdido. Este ajuste se realizó tanto para la temperatura de las muestras de leche como para termografía infrarroja de las muestras de leche.

Posteriormente se realizó una limpieza de datos para los datos de temperatura de la leche y la termografía infrarroja de las muestras de leche debido a que se presentaron valores extremos *i.e.*, mientras que la termografía presentaba un aumento, la temperatura real disminuía. Para eliminar dichos valores extremos se procedió a realizar un análisis de regresión simple entre los valores de temperatura de las muestras de leche con la termografía de las muestras de leche, utilizando bandas de predicción con un intervalo de confianza 0.90 (Di Rienzo *et al.*, 2014). Luego se procedió a eliminar los valores que estaban fuera de las bandas de predicción. Una vez realizada la limpieza quedaron datos de 127 cuartos mamarios.

Las variables analizadas fueron clasificadas en: parámetros asociados con el grado de mastitis (CMT, RCS, UFC); parámetros de desempeño animal [temperatura rectal, producción de leche (kg/ordeño), días en leche (**DEL**)]; variables de temperatura de muestras de leche [termografía infrarroja promedio de las muestras de leche (**TIRM**), temperatura real de las muestras de leche (**TrealM**) y termografía infrarroja máxima de las muestras de leche (**TIRMxM**)]. Las variables de RCS y UFC fueron transformadas para así tener datos normales, estas variables fueron transformadas a: recuento lineal de células somáticas (**RLCS**) usando la función logaritmo base 2, utilizada por el DHIP [ $RLCS = \text{Log}_2(RCS \cdot 100,000^{-1}) + 3$ ] y logaritmo natural de unidades formadoras de colonias (**LnUFC**) [ $\text{LnUFC} = \text{Ln}(UFC)$ ], respectivamente.

Los promedios de cada una de las variables fueron analizados con un modelo lineal general mixto (GLIMMIX) y comparado entre los grupos de categorización según RCS bajo, intermedio y alto; cuartos mamarios [delantero derecho (A), delantero izquierdo (B), trasero derecho (C), trasero izquierdo (D)] y patógenos, para de esta manera determinar si había diferencias en las variables dependiendo del grupo de categorización (RCS), cuartos mamarios y patógenos. Además se evaluó la normalidad y varianzas homogéneas usando proc GLIMMIX/student panel (SAS 9.3, 2010).

Para el análisis de las variables por patógenos se utilizaron 94 cuartos mamarios sin realizar limpieza de datos debido a la limitación de los mismos. Se determinó la prevalencia de los patógenos utilizando proc FREQ (SAS 9.3, 2010), para evaluar la distribución porcentual de casos de mastitis con sus respectivos patógenos. Para los promedios de las variables analizadas (LnUFC, RLCS, temperatura real y termografía infrarroja de las muestras de leches), se realizaron correlaciones.

El modelo estadístico fue el siguiente:

$$Y_{ij} = \mu + \alpha_i + \beta_j + \gamma_k + \varepsilon_{ijk}$$

En donde los componentes del modelo son:

$Y_{ij}$  = Variable dependiente analizada (evaluadora mastitis, temperatura, desempeño animal)

$\mu$  = Media general estimada

$\alpha_i$  = Efecto del RCS, i

$\beta_j$  = Efecto del cuarto mamario, j

$\gamma_k$  = Efecto del patógeno mastítico, k

$\varepsilon_{ijk}$  = Error experimenta de los efectos fijos, ijk

En el caso de que las variables mostraran varianzas significativas para el RCS, cuarto mamario o patógeno se realizó una comparación de medias con la opción LS-MEANS PDIFF/adjust Tukey ( $\alpha=0.05$ ) con un valor de significancia  $< 0.05$  (SAS 9.3, 2010).

Se realizó correlaciones entre las variables analizadas y los datos climáticos (temperatura ambiental, HR ), usando proc CORR (SAS 9.3, 2010), para evaluar la relación entre cada una de las variables. Se utilizó en función del coeficiente de correlación lineal de Pearson ( $r$ ). Posteriormente se llevó a cabo una selección de variables para determinar la influencia de cada una de estas sobre el RLCS de muestras de leche para el análisis de regresión, utilizando el método R- cuadrado, proc REG /selection=rsquare (SAS 9.3, 2010). El modelo final se analizó con un proc REG para generar una ecuación de predicción del RLCS en función de la TIRM y TrealM.

### 3.4 Resultados y discusión

#### 3.4.1 Variables de temperatura en muestras de leche

En lo que respecta a variables de temperatura estas fueron clasificadas en TIRM, TIRMxM y TrealM. Estas variables no presentaron diferencias significativas ( $P > 0.05$ ) según las categorías de RCS en la leche (Tabla 1). Sin embargo, los promedios  $\pm$  error estándar de las variables analizadas para RCS-alto fue TIRM  $34.66 \pm 0.51^{\circ}\text{C}$ , TIRMxM  $35.26 \pm 0.14^{\circ}\text{C}$  y TrealM  $34.82 \pm 0.14^{\circ}\text{C}$  (Tabla 1). Polat y colaboradores (2010) reportaron un incremento en la temperatura de la superficie de la ubre utilizando TIR, de  $33.23$  a  $36.27^{\circ}\text{C}$  a medida que incrementaba el RCS desde  $65 \times 10^3 \text{ cel.ml}^{-1}$  a  $3,653 \times 10^3 \text{ cel.ml}^{-1}$  en leche. En otra investigación, Colak y colaboradores (2008) determinaron que la temperatura de las superficie de la ubre incrementó de  $33.19$  a  $36.15^{\circ}\text{C}$  según incrementaron los valores de CMT de 0 a 3.

Se ha reportado que a medida que aumenta el RCS, el grado de infección de la glándula mamaria va a ser mayor (Dohoo y Meek, 1982; Reneau, 1986; Harmon, 1994), lo cual está asociado con una respuesta inflamatoria controlada por el sistema inmune adquirido e innato para poder erradicar la misma (Oviedo-Boyso *et al.*, 2007). Como parte de la respuesta inflamatoria ocurre vasodilatación la cual facilita los eventos inflamatorios (disminución de la velocidad de paso de flujo sanguíneo, incrementa la permeabilidad vascular y aumento de temperatura del área afectada) (Montero González *et al.*, 2001; García Barreno, 2008). Esta respuesta tiene como objetivo movilizar la mayor cantidad de componentes inmunes al área de insulto para que se pueda controlar la infección (Newman, 2013).

Por consiguiente, al existir un aumento en el RCS la respuesta inflamatoria sería mayor y por lo tanto se esperaría observar un aumento en temperatura de las muestras de leche a medida que aumenta el grado de infección. Sin embargo, este aumento no fue significativo entre los

diferentes grupos de clasificación según el RCS, debido a que existen otros factores (*e.g.*, climáticos o de desempeño animal) que producen una variación en la temperatura de las muestras de leche, superior al cambio en temperatura asociado con el proceso inflamatorio (Tabla 3).

**Tabla 1. Promedios  $\pm$  error estándar de las variables de temperatura en muestras de leche según el recuento de células somáticas.**

| Variables °C              | Categorización según el RCS (células.ml <sup>-1</sup> ) · 10 <sup>3</sup> |                                  |                     | Valor - P |
|---------------------------|---|----------------------------------|---------------------|-----------|
|                           | Bajo<br><200 (n=67)   | Intermedio<br>≥200 a ≤750 (n=18) | Alto<br>>750 (n=42) |           |
| <b>TIRM<sup>€</sup></b>   | 34.43 $\pm$ 0.12  | 34.53 $\pm$ 0.23                 | 34.66 $\pm$ 0.51    | 0.51      |
| <b>TIRMxM<sup>Σ</sup></b> | 35.11 $\pm$ 0.12  | 35.22 $\pm$ 0.23                 | 35.26 $\pm$ 0.14    | 0.70      |
| <b>TrealM<sup>α</sup></b> | 34.67 $\pm$ 0.11  | 34.90 $\pm$ 0.21                 | 34.82 $\pm$ 0.14    | 0.51      |

€ Termografía infrarroja promedio de las muestras de leche.

Σ Termografía infrarroja máxima de las muestras de leche.

α Temperatura real de las muestras de leche.

### 3.4.2 Variables de temperatura como herramienta para diagnosticar casos de mastitis

Se determinaron los parámetros de diagnóstico predictivo de variables de temperatura (TIRM, TIRMxM, TrealM). Las mismas tuvieron una habilidad para detectar cuartos con mastitis (sensibilidad) con valores entre 48 a 56.66% y valores entre un 46 a 52.22% para diagnosticar animales saludables (especificidad). Las variables fueron capaces de detectar en cuartos con mastitis una temperatura mayor a la del punto de corte en un 44.60 a 51% (valor predicho positivo) y tuvieron la habilidad de que en cuartos saludables no se detecte una temperatura mayor al punto de corte entre un 50 a 57% (valor predicho negativo) (Tabla 2). En adición se determinó la capacidad de diagnóstico de la prueba de CMT, teniendo un valor de 83% para sensibilidad, 96% para especificidad, 92% para valor predicho positivo y un 85% para valor predicho negativo (Tabla 2).

**Tabla 2. Parámetros predictivos de diagnóstico de las variables de temperatura y prueba de mastitis californiana**

| Variables                 | Punto de corte ><br>200 x 10 <sup>3</sup> cél.ml <sup>-1</sup> | Parámetros predictivos de diagnóstico (%) |               |                   |                   |
|---------------------------|--|---|---------------|-------------------|-------------------|
|                           |  | Sensibilidad                              | Especificidad | VP + <sup>o</sup> | VP - <sup>κ</sup> |
| <b>TIRM<sup>€</sup></b>   | > 34.50°C  | 56.66                                     | 52.22         | 51.00             | 57.00             |
| <b>TIRMxM<sup>Σ</sup></b> | > 35.23°C  | 51.66                                     | 56.70         | 52.00             | 56.70             |
| <b>TrealM<sup>α</sup></b> | > 34.78°C  | 48.00                                     | 46.00         | 44.60             | 50.00             |
| <b>CMT<sup>σ</sup></b>    | > 0.00 <sup>£</sup>  | 83.00                                     | 96.00         | 92.00             | 85.00             |

<sup>o</sup> Valor predicho positivo.

<sup>κ</sup> Valor predicho negativo.

€ Termografía infrarroja promedio de las muestras de leche.

Σ Termografía infrarroja máxima de las muestras de leche.

α Temperatura real de las muestras de leche.

σ Prueba de mastitis californiana con sus siglas en ingles CMT.

£ Valor de la prueba de CMT correspondiente a un resultado >200 x 10<sup>3</sup> cél.ml<sup>-1</sup>.

La determinación de parámetros de diagnóstico predictivo de mastitis utilizando como sintomatología un aumento en la temperatura de la leche mediante TIR no se ha documentado previamente. Sin embargo, Polat y colaboradores (2010), determinaron la sensibilidad, especificidad valor predicho positivo y negativo de la TIR usando como objetivo de imagen la superficie de la ubre, reportando valores de 95.6, 93.6, 95 y 93.6% respectivamente. Estos valores fueron más altos a los encontrados en la presente investigación. Esto se debe a que Polat y colaboradores (2010) trabajaron con animales previamente a-climatizados a una temperatura ambiental controlada para evitar variaciones en la temperatura de la ubre por radiación, velocidad del viento, temperatura ambiental. En la presente investigación los animales estuvieron bajo condiciones normales de campo, generando otros factores (climáticos, actividad, descanso) que pudieren causar una variación en la temperatura de la leche (Tabla 3). Este escenario pudo estar asociado con casos de falsos positivos, causando valores bajos para sensibilidad, especificidad, valores predichos positivos y valores predichos negativos.

Los parámetros de diagnóstico predictivo utilizando la prueba de CMT presentados en la tabla 2 fueron comparados con los de la investigación realizada por Polat y colaboradores (2010), en donde se reportaron valores de sensibilidad de 88.9%, especificidad de 98.9%, valor predicho positivo de 99.2% y valor predicho negativo de 86.1%. Además, en el (2013) Fosgate y colaboradores determinaron una sensibilidad y especificidad de 94.7 y 77.7%, respectivamente, para la prueba de CMT. Sin embargo, en otra investigación Sargeant y colaboradores (2001) determinaron los valores de sensibilidad para detectar infecciones intramamarias y clasificarlas por patógenos mayores y menores utilizando la prueba de CMT, estableciendo valores de 66.7 y 49.5% respectivamente. Por lo tanto la prueba de CMT es una herramienta que presenta una mayor confiabilidad para detectar casos de mastitis, comparado con el perfil térmico de la leche.

### 3.4.3 Correlaciones de las variables de temperatura

Las correlaciones entre TrealM con la TIRM y TIRMx, presentaron valores  $r = 0.58$ ; ( $P < 0.001$ ) y  $r = 0.62$ ; ( $P < 0.001$ ), respectivamente (Tabla 3). Aunque se esperaba correlaciones mayores entre estas variables. Sin embargo, la TrealM presentó correlaciones con las variables de temperatura ambiental  $r = -0.25$  ( $P < 0.0048$ ) y humedad relativa  $r = 0.25$  ( $P < 0.0043$ ) lo cual pudo causar que estas actúen sobre la TrealM ocasionando una disminución en las correlaciones con TIRM y TIRMxM (Tabla 3). En adición, West y colaboradores (2003) reportaron las variables que afectan la temperatura de la leche en el ordeño de la mañana y de la tarde siendo la lectura de temperatura ambiental más fría con un valor ( $r = 0.13$ ) y la temperatura promedio del ambiente con un valor ( $r = 0.34$ ) respectivamente. Por otro lado, las variables TIRM y TIRMxM no estuvieron asociadas ( $P > 0.05$ ) con las variables climáticas (Tabla3). Esto pudo ser debido a que la cámara termográfica ya presentó un ajuste de las variables climáticas (humedad relativa y temperatura ambiental), al momento que se configuró (FLIR, 2014). Sin embargo, la TIRM y

TIRMxM estuvieron correlacionadas ( $P < 0.05$ ) con las variables de actividad y descanso del animal con coeficientes de correlación entre (0.26 y 0.24) y (-0.24 y -0.26), respectivamente. Es decir que a mayor actividad del animal, se incrementa la temperatura de las muestras de leche y si el animal descansaba más las temperatura de la leche disminuía (Tabla 4). Lo mencionado anteriormente coincide con lo reportado por Berry y colaboradores (2003) donde la temperatura de la ubre incrementó 1°C cuando los animales fueron sometidos a un periodo de actividad/ejercicio. Este aumento en temperatura se debe a las fluctuaciones del ritmo cardiaco (Bitman *et al.*, 1984) y por la alta vascularidad que presenta la glándula mamaria (West *et al.*, 1999). La temperatura de la leche puede variar según la actividad del animal.

En adición, las variables TIRM, TIRMxM y TrealM no presentaron correlaciones significativas con el RLCS y CMT, presentando rangos de correlaciones entre (0.06 a 0.12), y (0.13 a 0.17), respectivamente (Tabla 3).

**Tabla 3. Correlaciones simples entre las variables de temperaturas y otras variables analizadas.**

| Variables         | Variables de temperatura |           |        |           |        |           |
|-------------------|--------------------------|-----------|--------|-----------|--------|-----------|
|                   | TIRM                     |           | TrealM |           | TIRMxM |           |
|                   | r                        | Valor - P | r      | Valor - P | r      | Valor - P |
| <b>RLCS</b>       | 0.09                     | 0.3268    | 0.12   | 0.1824    | 0.06   | 0.5246    |
| <b>CMT</b>        | 0.17                     | 0.0536    | 0.14   | 0.1289    | 0.13   | 0.1408    |
| <b>TIRM</b>       | 1.00                     | -         | 0.58   | <.0001    | 0.95   | <.0001    |
| <b>TrealM</b>     | 0.58                     | <.0001    | 1.00   | -         | 0.62   | <.0001    |
| <b>TIRMxM</b>     | 0.95                     | <.0001    | 0.62   | <.0001    | 1.00   | -         |
| <b>TRectal</b>    | -0.03                    | 0.7613    | -0.11  | 0.2114    | 0.02   | 0.8628    |
| <b>Producción</b> | -0.08                    | 0.3885    | 0.02   | 0.8055    | -0.06  | 0.5096    |
| <b>Actividad</b>  | 0.26                     | 0.0122    | 0.10   | 0.3532    | 0.24   | 0.0222    |
| <b>Descanso</b>   | -0.24                    | 0.0253    | 0.02   | 0.8828    | -0.26  | 0.0144    |
| <b>Tambiental</b> | -0.12                    | 0.1709    | -0.25  | 0.0048    | -0.09  | 0.2995    |
| <b>HR</b>         | 0.09                     | 0.3019    | 0.25   | 0.0043    | 0.07   | 0.4293    |
| <b>ITH</b>        | -0.14                    | 0.1285    | -0.23  | 0.0079    | -0.10  | 0.2471    |

RLCS = Recuento lineal de células somáticas

CMT = Prueba de mastitis californiana

TIRM = Termografía infrarroja promedio de las muestras de leche

TrealM = Temperatura real de las muestras de leche

TIRMxM = Termografía infrarroja máxima de las muestras de leche

Producción = Producción de leche (kg.ordeño<sup>-1</sup>)

Tambiental = Temperatura ambiental

HR = Humedad Relativa

ITH = Índice de temperatura humedad

#### 3.4.4 Parámetros asociados con el grado de mastitis

Los parámetros asociados con el grado de mastitis (RLCS, CMT y LnUFC) coinciden según el grupo de clasificación de RCS y fueron significativamente diferentes ( $P < 0.05$ ). Los valores de RLCS según la categorización de RCS bajo, intermedio y alto, fueron de  $1.10 \pm 0.15$ ,  $4.80 \pm 0.32$  y  $7.16 \pm 0.20$ , respectivamente (Tabla 4). El promedio de puntaje de la prueba de CMT para el grupo bajo, intermedio y alto fueron  $0.07 \pm 0.09$  (0),  $0.91 \pm 0.18$  (1) y  $2.18 \pm 0.12$  (2), respectivamente. Estos valores de CMT en RCS fueron: negativo (0) = 0 a  $200 \times 10^3$  cél.ml<sup>-1</sup>, 1 (trazas) =  $200 \times 10^3$  a  $400 \times 10^3$  cél.ml<sup>-1</sup> y 2 (1) =  $400 \times 10^3$  a  $1,200 \times 10^3$  cél.ml<sup>-1</sup> (Tabla 4). La prueba de CMT, permite estimar indirectamente el RCS. Polat y colaboradores (2010) reportaron, que cuando el animal presentaba un RCS de  $65 \times 10^3$  cél.ml<sup>-1</sup> el valor de la prueba de CMT era negativo y cuando el RCS incrementaba a  $3,653 \times 10^3$  cél.ml<sup>-1</sup> el valor de la prueba de CMT incrementaba a 3, confirmando que el valor del CMT va a ser mayor a medida que incremente el RCS. Esto se debe a que el detergente que usa el CMT degrada las membranas de células somáticas exponiendo su ADN, posteriormente se unirán los ácidos nucleicos formando un gel y dependiendo de su viscosidad se estima el RCS (Schalm y Noorlander 1957; Viguier *et al.*, 2009)

Los valores de LnUFC, para los grupos según RCS bajo, intermedio y alto fueron:  $0.98 \pm 0.55$ ,  $4.08 \pm 1.01$  y  $4.31 \pm 0.68$ , respectivamente. El RCS-bajo fue significativamente diferente ( $P < 0.05$ ) a los otros grupos. Sin embargo, el RCS-intermedio y RCS-alto no fueron significativamente diferentes entre sí (Tabla 4). La razón por la cual no se encontró diferencias en LnUFC entre los grupos intermedio y alto podría ser debido a que la mayoría de los animales con RCS-alto, se encontraban bajo tratamiento de mastitis y esto pudo causar que la carga bacteriana disminuyera. Aunque Paradis y colaboradores (2010), mencionan que las bacterias como *S. aureus* y *ECN* son patógenos normales de la ubre o del canal del pezón, es difícil saber si en

realidad las UFC son de origen de una infección intramamaria, lo cual puede causar de falsos positivos al momento de dar un diagnóstico.

En adición Paradis *et al.*, (2010) mencionaron que el uso de  $>1,000 \text{ UFC.ml}^{-1}$  ( $6.90 \text{ LnUFC.ml}^{-1}$ ) utilizado como punto de referencia para detectar una infección intramamaria en un cultivo puro es muy bajo para ser considerado como un indicador confiable y viceversa. Sin embargo, los valores en la presente investigación para animales con mastitis fue de  $4.08 - 4.31 \text{ LnUFC.ml}^{-1}$ . Estos valores son bajos debido a que animales que presentaron valores de  $>200 \times 10^3 \text{ cél.ml}^{-1}$ , no presentaron crecimiento bacteriano.

**Tabla 4. Evaluación de los promedios  $\pm$  error estándar de los parámetros asociados con el grado de mastitis según el recuento de células somáticas.**

| Variables                              | Categorización según el RCS ( $\text{cél.ml}^{-1}$ ) $\cdot 10^3$ |    |                                       |    |                   |    | Valor-P |
|--|---|----|---------------------------------------|----|-------------------|----|---------|
|  | Bajo<br><200  | n  | Intermedio<br>$\geq 200$ a $\leq 750$ | n  | Alto<br>>750      | n  |         |
| RLCS <sup><math>\alpha</math></sup>    | $1.10 \pm 0.15^c$   | 67 | $4.80 \pm 0.32^b$                     | 18 | $7.16 \pm 0.20^a$ | 42 | <0.0001 |
| CMT <sup><math>\sigma</math></sup>     | $0.07 \pm 0.09^c$   | 67 | $0.91 \pm 0.18^b$                     | 18 | $2.18 \pm 0.12^a$ | 42 | <0.0001 |
| LnUFC <sup><math>\epsilon</math></sup> | $0.98 \pm 0.55^b$   | 41 | $4.08 \pm 1.0^a$                      | 13 | $4.31 \pm 0.68^a$ | 27 | 0.0004  |

Diferentes letras son significativamente diferentes.

$\alpha$  Recuento lineal de células somáticas.

$\sigma$  Prueba de mastitis californiana con sus siglas en inglés CMT.

$\epsilon$  Transformación Logarítmica de unidades formadoras de colonias.

### 3.4.5 Correlaciones de los parámetros asociados al grado de mastitis

La correlación entre RLCS y LnUFC presentó un valor de 0.39 ( $P = 0.0003$ ) (Tabla 5), lo que significa que a medida que aumentó los RLCS el LnUFC también incrementó. Lo mencionado anteriormente se debe a que al existir una mayor infección, es decir un incremento de la cantidad de bacterias (LnUFC), existirá un aumento de células inmunes para erradicar la infección intramamaria (Oviedo-Boyso *et al.*, 2007).

La prueba de CMT obtuvo una correlación positiva significativa con el RLCS, con un coeficiente de correlación 0.73 ( $P < 0.0001$ ) (Tabla 5). Daniel y colaboradores (1966) reportaron que la correlación entre la prueba de CMT y conteo de leucocitos en muestras de leche fue de

0.81, demostrando que la prueba de CMT es un indicador eficiente del grado mastitis. Los resultados de las correlaciones entre RLCS y CMT se debe principalmente a que al existir un mayor número de bacterias en el cuarto mamario, la cantidad de células somáticas será mayor (Oviedo-Boyso *et al.*, 2007).

El LnUFC (cantidad de bacterias) presentó una correlación significativa con el RLCS ( $r = 0.39$ ;  $P < 0.003$ ), CMT ( $r = 0.33$ ;  $P < 0.0027$ ) y tipo de patógeno ( $r = 0.53$ ;  $P < 0.001$ ); (Tabla 5). En otra investigación Oliveira y colaboradores (2013) presentaron una correlación de 0.47 entre UFC y RCS en muestras de leche de ovejas. Además, de Haas y colaboradores (2002), reportaron que el RCS va a variar dependiendo del tipo de patógeno que cause la infección, esta variación en RCS se debe al comportamiento de la bacteria la cual puede aumentar o disminuir las unidades formadoras de colonias. Estos comportamientos fueron descritos por de Haas *et al.* (2004) donde *Escherichia coli* estuvo significativamente asociado con pequeños aumentos de RCS, *S. aureus* estuvo asociado con un gran incremento de RCS, mientras que *Streptococcus* no estuvo asociado con un patrón definido de comportamiento de RCS.

**Tabla 5. Correlaciones simples entre los parámetros asociados al grado de mastitis.**

| Variable     | Parámetros asociados al grado de mastitis |          |      |          |       |          |          |          |
|--------------|---|----------|------|----------|-------|----------|----------|----------|
|              | RCS                                       |          | CMT  |          | LnUFC |          | Patógeno |          |
|              | r   | Valor- P | r    | Valor- P | r     | Valor- P | r        | Valor- P |
| <b>RLCS</b>  | 0.83                                      | <.0001   | 0.73 | <.0001   | 0.39  | 0.0003   | 0.04     | 0.753    |
| <b>RCS</b>   |   |          | 0.73 | <.0001   | 0.35  | 0.0012   | 0.04     | 0.7305   |
| <b>CMT</b>   |   |          |      |          | 0.33  | 0.0027   | 0.06     | 0.6116   |
| <b>LnUFC</b> |   |          |      |          |       |          | 0.53     | <.0001   |

RLCS = Recuento lineal de células somáticas

RCS = Recuento de células somáticas

CMT = Prueba de mastitis californiana

LnUFC = Logaritmo natural de unidades formadoras de colonias

Patógenos = Patógeno mastítico

### 3.4.6 Parámetros de desempeño animal

Los parámetros de DEL, producción de leche (Kg. ordeño<sup>-1</sup>) y temperatura rectal (°C), fueron clasificados como variables que influyen el desempeño animal. Los valores de DEL no

fueron significativamente diferentes ( $P = 0.92$ ) para cada grupo de clasificación según el RCS, presentado valores de  $116 \pm 9$ ,  $108 \pm 18$  y  $115 \pm 12$  días, para RCS-bajo, RCS-intermedio y RCS-alto, respectivamente (Tabla 6). Al balancear los valores para cada grupo por DEL no se presentó un efecto en el nivel de producción a causa de este parámetro. Varios autores (Schutz *et al.*, 1990; Lescourret y Coulon 1994) han demostrado el comportamiento de producción de leche durante la curva de lactación. A partir de los 35 a 38 días los animales empiezan a alcanzar su pico de producción y posteriormente disminuyen la producción hasta llegar a los 305 días. Además Silvestre *et al.* (2009) analizaron resultados de 95,405 lactaciones y reportaron una producción de leche a los  $48 \pm 8$  días de  $27.6$  kg y al final de la lactación ( $344 \pm 4$  días) de  $13.4$  kg.

La producción de leche de los animales que tenían valores de RCS-bajo (saludables), RCS-intermedio y RCS-alto presentaron un promedio  $\pm$  error estándar de  $10.07 \pm 0.35$ ,  $7.91 \pm 0.71$  y  $9.16 \pm 0.46$  kg.ordeño<sup>-1</sup>, respectivamente ( $P = 0.002$ ). El RCS-bajo presentó el mayor nivel de producción. Sin embargo, el grupo de RCS-alto no fue significativamente diferente de los otros, pero el grupo RCS intermedio si presentó el nivel de producción más bajo con  $7.91$  kg por ordeño (Tabla 6). Esto concuerda con los modelos de predicción realizados por Jones y colaboradores (1984) en los que reportaron que animales de primera y segunda lactación con menos de  $200 \times 10^3$  cél.ml<sup>-1</sup> producen de  $0.55$  a  $1.05$  kg y  $1.18$  a  $2.37$  kg más de leche/día respectivamente, cuando fueron comparados con animales de  $>200 \times 10^3$  cél.ml<sup>-1</sup>. En la presente investigación, se observó que el grupo con RCS-alto presentó valores más altos de producción de leche comparados con el grupo de RCS-intermedio. Estos resultados se deben a que la mayoría de animales que se analizaron en el grupo RCS-alto ya se encontraban bajo un tratamiento para la mastitis y que pudo haber ocasionado que el nivel de producción se haya re-establecido. En adición, Hogeveen (2005) menciona que un riesgo para tener mastitis es el alto nivel de

producción por vaca, por lo que pudiera ser que en la presente investigación el grupo de RCS-alto eran animales altos productores y al ya estar bajo un tratamiento se estaba re-estableciendo su alto nivel de producción. Por otro lado, el nivel de producción con el RLCS presentaron una correlación negativa ( $r = -0.23$ ;  $P < 0.05$ ) (Tabla 7); a medida que aumenta el RLCS la producción disminuye. Esto coincide con lo reportado por Hinrichs y colaboradores (2005) quienes obtuvieron una correlación  $r = -0.29$  entre RCS y producción de leche. En adición, Hand *et al.* (2012) reportaron que las pérdidas en producción leche cuando incrementó el RCS en animales que tenían valores promedio de  $200 \times 10^3$  cél.ml<sup>-1</sup> fueron de 0.35 a 1.09 kg de leche por día y en animales con  $2,000 \times 10^3$  cél.ml<sup>-1</sup> la pérdida de leche fue de 1.49 a 4.70 kg de leche al día. Además, en la presente investigación el nivel de producción de leche presentó una correlación negativa con Índice de Temperatura Humedad (ITH) ( $r = -0.24$ ;  $P < 0.01$ ). A medida que el animal se encuentra en estrés por calor la síntesis de leche se ve reducida. Bohmanova y colaboradores (2007) determinaron el efecto de ITH sobre la producción de leche. Estos autores identificaron que a un ITH  $> 65$  la producción de leche comenzaba a disminuir. En la presente investigación el ITH promedio durante los días de toma de datos fue de 73. Bouraoui *et al.* (2002) evaluaron el efecto de ITH sobre la producción leche durante periodos de primavera (ITH =  $68 \pm 3.75$ ) y verano (ITH =  $78 \pm 3.23$ ) en clima mediterráneo; estos reportaron una correlación negativa entre ITH y producción de leche ( $r = -0.76$ ).

La temperatura rectal en los animales incluidos en el grupo RCS-alto fue de  $38.49 \pm 0.06$  °C, siendo diferente ( $P = 0.01$ ) a las temperaturas rectales de los otros grupos con RCS-intermedio ( $38.18 \pm 0.09$ °C) y RCS-bajo ( $38.29 \pm 0.05$ °C). El aumento significativo en temperatura rectal presentado por el grupo con RCS-alto, no es un efecto de un signo sistémico de mastitis ya que el valor de  $38.49$ °C se encuentra en la amplitud de valores normales de

temperatura rectal del ganado bovino lechero. Sánchez (2008) reportó que el promedio de la temperatura rectal en vacas lecheras bajo condiciones climáticas similares a la de la presente investigación fue de 38.54°C. Por lo que, el aumento en temperatura rectal en la presente investigación puede ser atribuido a que los animales que presentaban un mayor RCS fueron muestreados más tarde que los animales saludables cuando la temperatura ambiental ya había aumentado, lo cual causó ese aumento en temperatura rectal (Anejo 11). Kabuga (1992) reportó variaciones en temperatura rectal en vacas durante la mañana y en la tarde 38.6 y 39°C, respectivamente. Además reportó que las variables climáticas (temperatura ambiental y humedad relativa) explican hasta un 59.6% de las variaciones en temperatura rectal. Estos datos concuerdan con los encontrados en la presente investigación, donde las variables de temperatura ambiental y humedad relativa explican entre un 59 % y 55% de la variación de los valores de temperatura rectal. En adición, la temperatura rectal obtuvo una correlación negativa significativa con los DEL  $r = -0.35$  ( $P=0.0002$ ), es decir que a medida que aumentan DEL, la temperatura rectal disminuye (Tabla 7). Esta disminución en temperatura podría explicarse ya que los animales van reduciendo su metabolismo debido a un menor nivel de producción de leche (Silvestre *et al.*, 2009). Por lo tanto hay menor producción de calor por parte del animal (Kadzere *et al.*, 2002). En adición, la temperatura rectal presentó una correlación negativa con la actividad física  $r = -0.21$  ( $P = 0.047$ ) y el descanso  $r = -0.26$  ( $P = 0.01$ ) que realizaba el animal durante los días de estudio (Tabla 7). Con lo que respecta a la actividad del animal, a medida que aumentaba la temperatura rectal, el animal reducía su actividad, para de esta manera intentar reducir el exceso de calor que podía presentar la temperatura ambiental presentó una correlación negativa con la actividad  $r = -0.22$  ( $P = 0.03$ ), es decir a mayor temperatura ambiental el animal reducía su

actividad. Sin embargo, cuando el animal descansaba su temperatura rectal disminuía  $r = -0.26$  ( $P = 0.016$ ).

**Tabla 6. Evaluación de los promedios  $\pm$  error estándar de los parámetros de desempeño dependiendo del recuento de células somáticas.**

| Variables                | Categorización según el RCS (células.ml <sup>-1</sup> ) · 10 <sup>3</sup> |    |                           |    |                           |    | Valor- <i>P</i> |
|--------------------------|---|----|---------------------------|----|---------------------------|----|-----------------|
|                          | Bajo<br><200  | n  | Intermedio<br>≥200 a ≤750 | n  | Alto<br>>750              | n  |                 |
| DEL (días) <sup>α</sup>  | 116 ± 9   | 62 | 108 ± 18                  | 16 | 115 ± 12                  | 36 | 0.92            |
| Prod (kg) <sup>σ</sup>   | 10.07 <sup>a</sup> ± 0.35   | 62 | 7.91 <sup>b</sup> ± 0.71  | 16 | 9.16 <sup>ab</sup> ± 0.46 | 36 | 0.002           |
| T rectal °C <sup>Σ</sup> | 38.29 <sup>b</sup> ± 0.05   | 64 | 38.18 <sup>b</sup> ± 0.09 | 18 | 38.49 <sup>a</sup> ± 0.06 | 41 | 0.01            |

Promedios con diferentes letras son significativamente diferentes.

α Días en leche.

σ Producción de leche por ordeño

Σ Temperatura rectal de los animales en °C

**Tabla 7. Correlaciones simples entre los parámetros de desempeño animal y otras variables analizadas**

| Variable   | Parámetros de desempeño animal |                 |       |                 |            |                 |           |                 |          |                 |
|------------|--------------------------------|-----------------|-------|-----------------|------------|-----------------|-----------|-----------------|----------|-----------------|
|            | T rectal                       |                 | DEL   |                 | Producción |                 | Actividad |                 | Descanso |                 |
|            | r                              | Valor- <i>P</i> | r     | Valor- <i>P</i> | r          | Valor- <i>P</i> | r         | Valor- <i>P</i> | r        | Valor- <i>P</i> |
| RLCS       | 0.15                           | 0.10            | -0.05 | 0.56            | -0.23      | 0.013           | -0.04     | 0.69            | 0.04     | 0.70            |
| TIRM       | -0.03                          | 0.76            | 0.03  | 0.78            | -0.08      | 0.39            | 0.26      | 0.01            | -0.24    | 0.02            |
| TrealM     | -0.11                          | 0.21            | 0.00  | 0.98            | 0.02       | 0.81            | 0.10      | 0.35            | 0.02     | 0.88            |
| TIRMxM     | 0.02                           | 0.86            | -0.02 | 0.84            | -0.06      | 0.51            | 0.24      | 0.02            | -0.26    | 0.01            |
| TRectal    | 1.00                           | -               | -0.35 | 0.0002          | 0.01       | 0.94            | -0.21     | 0.047           | -0.26    | 0.01            |
| Producción | 0.01                           | 0.94            | 0.23  | 0.015           | 1.00       | -               | 0.01      | 0.91            | -0.25    | 0.01            |
| Actividad  | -0.21                          | 0.04            | 0.09  | 0.38            | 0.01       | 0.91            | 1.00      | -               | -0.24    | 0.02            |
| Descanso   | -0.26                          | 0.01            | 0.60  | <.0001          | -0.25      | 0.01            | -0.24     | 0.02            | 1.00     | -               |
| Tambiental | 0.59                           | <.0001          | -0.19 | 0.039           | -0.22      | 0.01            | -0.22     | 0.03            | -0.12    | 0.27            |
| HR         | -0.55                          | <.0001          | 0.20  | 0.031           | 0.15       | 0.12            | 0.21      | 0.05            | 0.19     | 0.07            |
| ITH        | 0.56                           | <.0001          | -0.16 | 0.08            | -0.24      | 0.01            | -0.20     | 0.06            | -0.09    | 0.39            |

RLCS = Recuento lineal de células somáticas

TIRM = Termografía infrarroja promedio de las muestras de leche

TrealM = Temperatura real de las muestras de leche

TIRMxM = Termografía infrarroja máxima de las muestras de leche

Trectal = Temperatura rectal

Producción = Producción de leche (kg.ordeño<sup>-1</sup>)

Tambiental = Temperatura ambiental

HR = Humedad Relativa

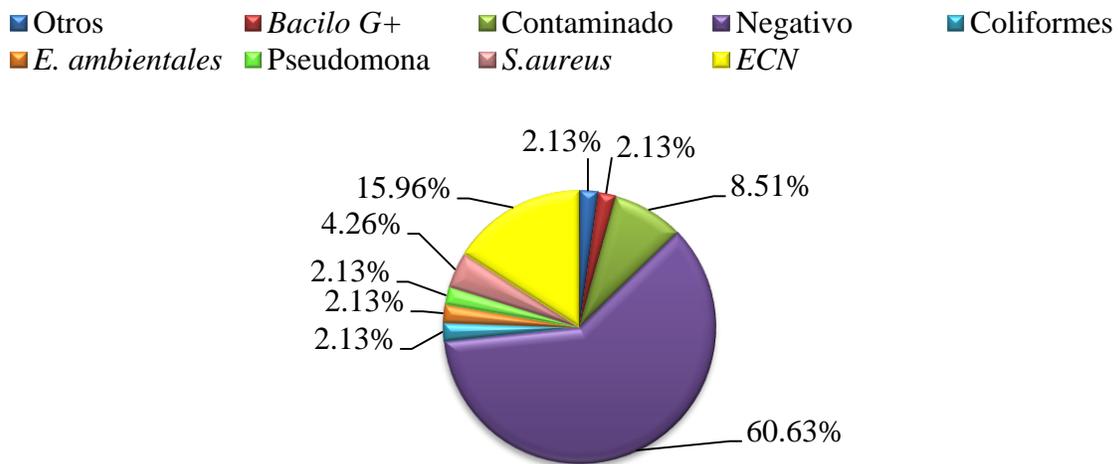
ITH = Índice de temperatura humedad

### 3.4.7 Efecto de patógenos mastíticos

El análisis de prevalencia de los patógenos mastíticos de la vaquería comercial en la que se realizó el estudio, con 94 cuartos mamarios analizados, fue de: casos negativos (60.63%), *Estafilococos coagulasa negativo (ECN)* (15.96%), *Estafilococos aureus (S. aureus)*, por sus siglas en inglés) (4.26%), *Estreptococos (E.) ambientales* (2.13%), *Coliformes* (2.13), *Bacilo*

*Gram positivo* (2.13%), *Pseudomonas* (2.13%) y otros patógenos (2.13%) (Figura 1). Esta distribución muestra un comportamiento normal en la incidencia de patógenos mastíticos en donde > 60% son cuartos libres de mastitis y la mayor prevalencia de los casos de mastitis son causado por *S. aureus* y *ECN*. Varios autores (Wilson *et al.*, 1997; Barkema *et al.*, 1998; Bradley, 2002) mencionan que entre 75 y 80% de los casos de mastitis son causado por; Coliformes, *E. ambientales*; *S. aureus*, y *ECN*.

**Figura 1. Prevalencia de patógenos mastíticos en un hato lechero comercial de Puerto Rico.**



Para cada patógeno se evaluó el LnUFC, RLCS, TrealM, TIRM y TIRMxM. Para el LnUFC entre cada patógeno fue diferente ( $P < 0.0001$ ), siendo *Bacilo G+*, Coliformes y *ECN* los que presentaron mayores promedios  $\pm$  error estándar  $9.77 \pm 1.17$ ,  $7.65 \pm 1.17$  y  $7.55 \pm 0.43$ , respectivamente. El RLCS presentó diferencias ( $P = 0.0007$ ), siendo *Pseudomonas* el que presentó el mayor promedio  $\pm$  error estándar de RLCS ( $7.68 \pm 1.83$ ) y *E. ambientales*, casos negativos y contaminados fueron los que presentaron los menores promedios  $\pm$  error estándar de RLCS  $1.64 \pm 1.82$ ,  $2.83 \pm 0.34$  y  $2.60 \pm 0.91$ , respectivamente. Mientras que la TrealM, TIRM y TIRMxM no fueron diferentes ( $P > 0.05$ ) entre los patógenos mastíticos (Tabla 8).

**Tabla 8. Evaluación de parámetros evaluadores del grado de mastitis y variables de temperatura según el tipo de patógeno.**

| Patógeno              | n  | LnUFC <sup>€</sup>       | RLCS <sup>£</sup>        | TrealM <sup>α</sup> | TIRM <sup>κ</sup> | TIRMxM <sup>Σ</sup> |
|-----------------------|----|--------------------------|--------------------------|---------------------|-------------------|---------------------|
| <i>Bacilo G+</i>      | 2  | 9.77±1.17 <sup>a</sup>   | 7.14±1.83 <sup>a,b</sup> | 34.81±0.80          | 35.76±0.82        | 36.26±0.79          |
| <i>ECN</i>            | 15 | 7.55±0.43 <sup>a</sup>   | 4.78±0.67 <sup>b</sup>   | 35.06±0.29          | 34.76±0.30        | 35.24±0.29          |
| <b>Coliformes</b>     | 2  | 7.65±1.17 <sup>a</sup>   | 5.11±1.83 <sup>a,b</sup> | 34.35±0.80          | 34.80±0.82        | 35.8±0.79           |
| <b>Contaminados</b>   | 8  | 2.63±0.58 <sup>b</sup>   | 2.60±0.91 <sup>c</sup>   | 35.01±0.40          | 34.61±0.41        | 35.28±0.40          |
| <i>E. ambientales</i> | 2  | 5.64±1.17 <sup>a,b</sup> | 1.64±1.82 <sup>c</sup>   | 34.15±0.80          | 33.50±0.82        | 34.30±0.79          |
| <b>Negativo</b>       | 57 | 0.00±0.00 <sup>c</sup>   | 2.83±0.34 <sup>c</sup>   | 34.50±0.15          | 34.26±0.15        | 34.89±0.15          |
| <i>Pseudomonas</i>    | 2  | 6.47±1.17 <sup>a,b</sup> | 7.68±1.83 <sup>a</sup>   | 36.21±0.80          | 34.41±0.82        | 35.51±0.79          |
| <i>S. aureus</i>      | 4  | 5.92±0.83 <sup>a,b</sup> | 6.95±1.29 <sup>a,b</sup> | 35.68±0.56          | 35.74±0.58        | 36.36±0.56          |
| <b>Otros</b>          | 2  | 9.77±1.17 <sup>a</sup>   | 7.35±1.83 <sup>a</sup>   | 34.89±0.80          | 35.14±0.82        | 35.94±0.74          |
| <b>Valor - P</b>      |    | <0.0001                  | 0.0007                   | 0.205               | 0.1526            | 0.1391              |

Diferentes letras son significativamente diferentes.

€ Transformación logarítmica de unidades formadoras de colonias.

£ Recuento lineal de células somáticas.

α Temperatura real de muestras de leche.

κ Termografía infrarroja promedio de muestras de leche.

Σ Termografía infrarroja máxima de muestras de leche.

Las correlaciones de los promedio agrupados por patógenos, de RLCS con TIRMxM y TIRM presentaron coeficientes de 0.92 ( $P=0.0076$ ) y 0.88 ( $P=0.018$ ) respectivamente (Tabla 9). Es decir que a medida que aumenta el RLCS va a aumentar la TIR de las muestras de leche. Las correlaciones entre RLCS y TIR al agruparlas por patógenos vs con las que no se agruparon fueron mayores ( $r = 0.88$  vs  $r = 0.09$ ). Este aumento puede deberse a que al utilizar los promedios por patógenos se reduce el efecto de variabilidad dentro de un mismo patógeno y de esta manera se puede ver el efecto específico del patógeno sobre la inflamación (aumento en temperatura). De Haas y colaboradores (2002, 2004), mencionaron el patrón de comportamiento del grado de infección va a depender del patógeno y del tiempo de infección.

**Tabla 9. Correlaciones de los promedios de las variables analizadas para los patógenos mastíticos.**

|                           | <b>LnUFC<sup>€</sup></b> | <b>Treal<sup>α</sup></b> | <b>TIRMxM<sup>Σ</sup></b> | <b>TIRM<sup>ω</sup></b> |
|---------------------------|--------------------------|--------------------------|---------------------------|-------------------------|
| <b>RLCS<sup>£</sup></b>   | 0.62269                  | 0.71141                  | 0.83295                   | 0.72407                 |
|                           | 0.0992                   | 0.0478                   | 0.0102                    | 0.0423                  |
| <b>LnUFC<sup>€</sup></b>  | 1.00                     | 0.1354                   | 0.51376                   | 0.46349                 |
|                           | -                        | 0.7492                   | 0.1928                    | 0.2474                  |
| <b>TrealM<sup>α</sup></b> |                          | 1.00                     | 0.46572                   | 0.36909                 |
|                           |                          | -                        | 0.2448                    | 0.3682                  |
| <b>TIRMxM<sup>Σ</sup></b> |                          |                          | 1.00                      | 0.95442                 |
|                           |                          |                          | -                         | 0.0002                  |

Nota: Los valores presentados son los coeficientes de correlación de Pearson sobre sus respectivos niveles de significancia.

£ Recuento lineal de células somáticas.

€ Transformación logarítmica de unidades formadoras de colonias.

α Temperatura real de muestras de leche.

Σ Termografía infrarroja máxima de muestras de leche.

ω Termografía infrarroja promedio de muestras de leche

### 3.4.8 Modelo predictivo de recuento lineal de células somáticas

Se realizaron modelos de predicción de RLCS utilizando como variables independientes la TIRM, TIRMxM y TrealM como indicadores de mastitis junto con las variables climáticas (temperatura ambiental, HR, ITH). Sin embargo, los modelos solo explicaban entre 1 – 7% de la variación de los RLCS. Esto se debe a lo mencionado anteriormente en donde otras variables afectan a la TrealM (*e.g.*, temperatura ambiental, humedad), la TIR (*e.g.*, actividad y descanso del animal) y al RLCS (factores climáticos y patógenos) (Tabla 4, 5 y 9). Por lo que no se pudo obtener una ecuación de predicción que explique mejor la variación de los datos.

### 3.5 Conclusiones y recomendaciones

#### **Conclusiones:**

- No se encontró un aumento significativo en la temperatura infrarroja y real de las muestras de leche asociado al RCS.
- La termografía infrarroja explicó entre un 58 a 62 % de la variación de los datos de temperatura real de las muestras de leche.
- La temperatura de las muestras de leche fue afectada por las variables climáticas lo cual redujo la capacidad de la termografía infrarroja para estimar RCS.
- Los parámetros de diagnóstico predictivo de mastitis, sensibilidad, especificidad, valor predicho positivo y valor predicho negativo de mastitis utilizando termografía infrarroja fueron: 56.66%, 52.22%, 51.00% y 56.70%, respectivamente.
- Al agrupar los valores de TIRM y RLCS por patógeno se observó una correlación de  $r = 0.72$  ( $P=0.001$ )
- El análisis predictivo para estimar el RCS a partir de la temperatura real e infrarroja de las muestras de leche, explicó solo 1 – 7% de la variación de los datos, esto ya que no se presentó ningún tipo de correlación significativa entre el RCS y la temperatura real e infrarroja de las muestras de leche.
- El nivel de producción de leche del animal se ve afectado significativamente por el aumento en RCS.
- Los animales al encontrarse bajo estrés por calor ( $ITH = 73$ ) reducen el nivel de producción de leche.

- La temperatura rectal de los animales fue afectada por las condiciones climáticas, encontrando correlaciones mayores a 0.50 con las variables de temperatura ambiental y humedad relativa.
- La actividad y el descanso que presenten los animales se ve influenciado por la temperatura ambiental.

**Recomendaciones:**

- Realizar un estudio en donde se evalúen cómo las variables climáticas y variables de desempeño animal afectan la temperatura de la leche.
- Realizar el mismo experimento bajo condiciones controladas y en tiempo fijo de temperatura, para excluir el efecto de temperatura ambiental sobre la temperatura de la leche como evaluador de mastitis.
- Incrementar e uniformizar el número de muestras para el análisis de patógenos mastíticos y compararlos entre contagiosos vs no contagiosos.

## **4 USO DE TERMOGRAFÍA INFRARROJA EN COMPONENTES DE LA UNIDAD DE ORDEÑO COMO HERRAMIENTA PARA LA DETECCIÓN DE MASTITIS**

### 4.1 Introducción

La mastitis es la enfermedad más común en los hatos lecheros mundialmente, generando mayores pérdidas económicas en la industria lechera (Hovinen *et al.*, 2008). En Puerto Rico según el informe de la industria lechera para el año fiscal 201-2011 las pérdidas económicas por decomiso de leche a causa de problemas asociados con la mastitis fueron de \$765,393.13. Actualmente existen técnicas o pruebas a nivel de campo para evaluar el estado de salud de la glándula mamaria como lo son la prueba de mastitis californiana (**CMT**, por sus siglas en inglés), el contador celular de DeLaval (**DCC**, por sus siglas en inglés) estimador portable de células somáticas (**PORScC**) y conductividad eléctrica (**CE**). Sin embargo, se ha observado que estas técnicas son muy subjetivas, presentan altos costos, baja sensibilidad y sincronización de equipos, respectivamente (Viguier *et al.*, 2009). Debido a las limitaciones en estas técnicas para detectar mastitis, nuevas herramientas que sean capaces de detectar mastitis sub-clínica de manera subjetiva, práctica y confiable son necesarias para reducir el impacto de la mastitis en hatos lecheros.

Una alternativa para la detección de mastitis es el uso de termografía infrarroja (**TIR**) (Berry *et al.*, 2003; Colak *et al.*, 2008; Polat *et al.*, 2010). La TIR es una técnica moderna, no invasiva y segura que permite obtener la visualización del perfil térmico de superficies biológicas y no biológicas. Varios investigadores (Colak *et al.*, 2008; Hovinen *et al.*, 2008; Polat *et al.*, 2010; Curbelo-Rodríguez, 2011; Metzner *et al.*, 2014) han utilizado la TIR para detectar mastitis utilizando como objetivo la superficie de la ubre. Sin embargo, la implementación de la TIR utilizando como objetivo de imagen la piel de la glándula mamaria presenta varios problemas

relacionados con factores ambientales (*e.g.*, contaminación de la ubre por agua y desechos orgánicos) y manipulación de los animales (*e.g.*, a-climatizar los animales por 30 minutos antes de tomar la imagen, tomar varias IT de la ubre) (Colak *et al.*, 2008; Polat *et al.*, 2010; Curbelo-Rodríguez, 2011; Metzner *et al.*, 2014). Por lo tanto, utilizar un mejor objetivo de imagen para tomar la IT para detectar mastitis representaría una estrategia más práctica (Colak *et al.*, 2008; Polat *et al.*, 2010; Curbelo-Rodríguez, 2011).

El perfil térmico de la leche podría utilizarse para detectar mastitis debido a que la mastitis, al desarrollarse localmente a nivel de la glándula mamaria, podría ocasionar un aumento en la temperatura de la leche, debido a la respuesta inflamatoria que se produce a causa de la infección (Sordillo *et al.*, 1997; Oviedo-Boyso *et al.*, 2007). A consecuencia, se podría tomar imágenes termográficas (**IT**) de componentes de la unidad de ordeño que tengan contacto directo con la leche (*i. e.*; tubos cortos y colector de la máquina de ordeño) para evaluar la temperatura de esta. Al utilizar los tubos cortos como objetivo de IT se obtendría la temperatura de los cuartos mamaros individuales simultáneamente, lo que permitiría detectar específicamente que cuarto está infectado. Además, en el colector de leche se podría obtener la temperatura para estimar el estado de salud de la glándula mamaria completa. Por lo tanto, la hipótesis es que con solo una imagen se podría obtener las temperaturas tanto de los tubos cortos como la del colector de la máquina de ordeño simultáneamente durante el proceso normal de ordeño.

## 4.2 Objetivos

- Validar el uso de la termografía infrarroja en componentes de la unidad de ordeño para evaluar el perfil térmico de la leche como indicador de mastitis a nivel de campo.
- Evaluar parámetros predictivos de diagnóstico de la termografía infrarroja en componentes de la unidad de ordeño como herramienta de detección de mastitis sub-clínica.
- Desarrollar un modelo predictivo para determinar el contenido de células somáticas a partir de la temperatura infrarroja de componentes de la unidad de ordeño.

### 4.3 Materiales y Métodos

La metodología para la colección de datos se realizó paralelamente, es decir bajo las mismas condiciones, procedimientos, animales y durante el mismo día de prueba que en el capítulo tres. A diferencia de la toma de IT de muestras de leche, en el presente capítulo se tomó IT de componentes de la unidad de ordeño (*i.e.*, tubos cortos y colector). Cabe mencionar que solo se utilizó una unidad de ordeño; es decir mientras se analizaba solo una vaca a la vez, el resto continuaba en el proceso normal de ordeño.

#### 4.3.1 Toma de imágenes termográficas infrarrojas de componentes de la máquina de ordeño

La unidad de ordeño utilizada para ordeñar las vacas fue modificada para fines del estudio. En cada tubo corto se introdujo una sonda termal, HYP3-16-1-1/2-T-U-48-RP (OMEGA Engineering Inc.; Connecticut, USA) conectada a un termómetro 4 canales HH147U almacenador de datos (OMEGA Engineering Inc.; Connecticut, USA). La sonda termal se insertó a manera de que esta quede en la parte superior del tubo corto e inmediatamente abajo de la tetera de la unidad de ordeño, para de esta manera registrar la temperatura de la leche inmediatamente esta pase al tubo corto (Anejo 7). La temperatura de leche que pasaba a través de los tubos cortos se midió a tiempo real durante el ordeño en intervalos de 1 segundo desde el comienzo de la remoción de leche hasta que la unidad se retiró automáticamente, con el “software” “Temp Monitor\_S2 OMEGA”. Durante el ordeño, se usó la cámara termográfica FLIR modelo e-50, para coleccionar las IT de los tubos cortos y colector de la unidad de ordeño. Las IT se tomaron a una distancia de 1.5 m de tal forma que los cuatro tubos cortos y el colector de la unidad de ordeño fueran capturados simultáneamente (Anejo 8). Las IT se coleccionaban a partir de 1.5 minutos después de haber iniciado el ordeño (estabilización de la temperatura) y luego se tomó imágenes cada 30 segundos hasta que finalizara el mismo. Fue necesario esperar 1.5 minutos antes de la toma de IT de los

tubos cortos, debido a que existe un gradiente de temperatura entre la leche (mayor temperatura) y los tubos cortos de la máquina de ordeño (menor temperatura). El tiempo de 1.5 min fue establecido luego de haber realizado pruebas de validación en donde se observó que a partir de 1.5min de iniciado el ordeño la TIR se estabilizaba. Una vez que la temperatura se estabilizó se posicionó la cámara infrarroja de tal manera que se encuentre en la misma dirección de la luz (artificial) para obtener la radiación verdadera que emiten los tubos cortos y no la reflejada. Las IT que contiene los tubos cortos y el colector fueron automáticamente grabadas por la cámara termográfica. Una vez finalizado el proceso de ordeño, se aplicó un sellador (Ster-Bac, Ecolab) y se desinfectó la unidad de ordeño con agua con yodo.

#### 4.3.2 Parámetros predictivos de diagnóstico

Para el análisis de los parámetros predictivos de diagnósticos tales como: sensibilidad, especificidad, valores predichos positivos y predichos negativos, se realizó al igual que con la metodología del capítulo dos, utilizando los valores de temperatura real de la leche a través de los tubos cortos (**TrealT**), termografía infrarroja promedio de los tubos cortos (**TIRT**), termografía infrarroja máxima de los tubos cortos (**TIRMxT**), termografía infrarroja promedio del colector (**TIRC**), termografía infrarroja máxima del colector (**TIRMxC**) y la prueba de mastitis californiana CMT. Se clasificó a los cuartos mamarios como saludables a los que presentaran  $< 200 \times 10^3$  cél.ml<sup>-1</sup> y como cuarto mastíticos a los que tuvieran  $\geq 200 \times 10^3$  cél.ml<sup>-1</sup> y como temperatura de punto de corte a la que sea mayor a la temperatura promedio  $\pm$  error estándar de los saludables de cada variable de temperatura real e infrarroja.

#### 4.3.3 Análisis estadístico

Las imágenes termográficas infrarrojas fueron extraídas de la cámara termográfica y analizadas utilizando el “software” “FLIR Tools versión 4.1.1”. En cada tubo corto se colocó un

indicador con una circunferencia de 10 mm de diámetro. Esta se movió a lo largo del tubo corto para determinar cuál era el área donde presentaba una mayor la TIR y utilizar la temperatura de ese lugar. Para analizar la TIR del colector se realizó un elipse que cubriera la parte inferior del colector de la máquina de ordeño (Anejo 10).

Se realizó una limpieza de datos entre TrealT y la TIRT debido a que se presentaron valores extremos; mientras que la TIR presentaba un aumento, la temperatura real disminuía. Para eliminar dichos valores extremos, se procedió a realizar una regresión entre los valores de TrealT y TIRT con bandas de predicción con intervalos de confianza de 0.90 (Di Rienzo *et al.*, 2014) y se procedió a eliminar los valores que estaban fueran de las bandas de predicción. El análisis estadístico incluyó 129 cuartos mamarios.

Las variables analizadas fueron clasificadas en parámetros: asociados al grado de mastitis [CMT, recuento de células somáticas (**RCS**), unidades formadoras de colonia (**UFC**)], de desempeño animal [temperatura rectal ( $^{\circ}\text{C}$ ), producción de leche ( $\text{k.ordeño}^{-1}$ ), días en leche (**DEL**)] y de temperatura (TrealT, TIRT, TIRMxT, TIRC y TIRMxC). Las variables de RCS y UFC fueron transformadas para así tener datos normales, estas variables fueron transformadas a recuento lineal de células somáticas (**RLCS**) usando la función logaritmo base 2 (utilizado por el DHIP) y logaritmo natural respectivamente (**LnUFC**). Estas transformaciones se realizaron igual que en el capítulo dos. Los promedios de cada una de las variables fueron comparadas entre los grupos de categorización según el RCS-bajo, RCS-intermedio y RCS-alto, según los cuartos mamarios [delantero derecho (A), delantero izquierdo (B), trasero derecho (C) y trasero izquierdo (D)] y según el tipo de patógeno. En adición, se evaluó la normalidad y varianzas homogéneas usando proc GLIMMIX/student panel (SAS, 9.3<sup>®</sup>).

El modelo utilizado fue el mismo que el del capítulo tres. En el caso de las variables que mostraron varianzas significativas para el RCS o cuarto mamario, se realizó la comparación de medias con la opción LS-MEANS PDIFF/ adjust Tukey con un valor de significancia de  $< 0.05$  (SAS 9.3, 2010). La prevalencia de patógenos se determinó al igual que el capítulo dos y posteriormente los promedios por patógeno de RLCS, LnUFC y temperatura real de la leche a través del tubo y termografía infrarroja de los componentes de la unidad de ordeño, se realizó correlaciones entre los mismos.

Se realizaron correlaciones entre las variables analizadas y los datos ambientales (temperatura ambiente, HR y VV), usando proc CORR (SAS, 9.3<sup>®</sup>). La selección de variables para identificar las que poseen mayor influencia sobre el RLCS de muestras de leche para el análisis de regresión se determinaron a través del método R - cuadrado, proc REG/selection=rsquare (SAS, 9.3<sup>®</sup>). El modelo final se analizó con un proc REG (SAS, 9.3<sup>®</sup>) para tener una ecuación de predicción del RLCS en función de la TIR de los componentes de la unidad de ordeño y de la TrealT.

## 4.4 Resultados y discusión

### 4.4.1 Variables de temperatura

Las variables de TIRT, TIRMxT, TRealT, TIRC y TIRMxC, fueron evaluadas según el grupo de RCS-bajo, RCS-intermedio y RCS-alto. Los valores promedios  $\pm$  error estándar, para cada variable no fueron significativamente diferente ( $P>0.05$ ), según el RCS (Tabla 10). Sin embargo, se ha reportado que a medida que aumenta el RCS el nivel de infección de la glándula mamaria va a ser mayor (Dohoo y Meek, 1982; Reneau, 1986; Harmon, 1994). El aumento en RCS en leche está asociado a la respuesta inflamatoria la cual genera vasodilatación entre las respuestas secundarias. El proceso de vasodilatación se ve acompañado de una disminución en la velocidad del flujo sanguíneo, incremento de la permeabilidad vascular y consecuentemente un aumento de temperatura) (Montero González *et al.*, 2001; García Barreno 2008); con el objetivo de llevar mayor cantidad de componentes inmunes al área de insulto, para poder controlar la infección (Newman, 2013). El aumento en permeabilidad vascular y la vasodilatación ocasionan que la temperatura del área afectada sea similar a la temperatura del tronco del cuerpo ( $>$  temperatura). Por lo mencionado anteriormente, se espera que a medida que aumenta el RCS se esperaría encontrar un incremento en la temperatura del cuarto mastítico y por ende un incremento en la temperatura de leche. En otras investigaciones, Polat y colaboradores (2010) reportaron un incremento en la temperatura de la superficie de la ubre desde 33.23 hasta 36.27°C a medida que incrementaba el RCS desde  $65 \times 10^3$  hasta  $3,653 \times 10^3$  cel.ml<sup>-1</sup> en leche. Además, Colak y colaboradores (2008) mostraron que la temperatura de la superficie de la ubre incrementó desde 33.19 hasta 36.15°C según aumentaron los valores de CMT 0 hasta 3. En adición, las variables de temperatura estudiadas en el presente estudio, fueron afectadas por factores climáticos (humedad, temperatura ambiente) y de desempeño animal (tiempo de ordeño,

actividad, descanso, producción, temperatura rectal) lo que pudo causar un efecto en la variación de los datos de la temperatura de la leche (Tabla 12).

**Tabla 10. Evaluación de los promedios  $\pm$  error estándar de las variables de temperatura en función del recuento de células somáticas.**

| Variables °C              | Categorización según el RCS (células.ml <sup>-1</sup> ) · 10 <sup>3</sup> |    |                           |    |              |    | Valor-P |
|---------------------------|---|----|---------------------------|----|--------------|----|---------|
|                           | Bajo<br><200  | n  | Intermedio<br>≥200 - ≤750 | n  | Alto<br>>750 | n  |         |
| <b>TIRT<sup>α</sup></b>   | 33.42 ± 0.20  | 69 | 32.98 ± 0.38              | 20 | 33.57 ± 0.28 | 36 | 0.44    |
| <b>TIRMxT<sup>Σ</sup></b> | 33.95 ± 0.19  | 69 | 33.41 ± 0.36              | 20 | 33.97 ± 0.27 | 36 | 0.37    |
| <b>TRealT<sup>€</sup></b> | 38.36 ± 0.06  | 72 | 38.26 ± 0.12              | 20 | 38.29 ± 0.10 | 33 | 0.70    |
| <b>TIRC<sup>β</sup></b>   | 32.32 ± 0.18  | 69 | 31.75 ± 0.33              | 20 | 32.55 ± 0.25 | 36 | 0.15    |
| <b>TIRMxC<sup>⊖</sup></b> | 32.92 ± 0.17  | 69 | 32.57 ± 0.32              | 20 | 33.25 ± 0.24 | 36 | 0.22    |

<sup>α</sup> Termografía infrarroja promedio de los tubos cortos.

<sup>Σ</sup> Termografía infrarroja máxima de los tubos cortos.

<sup>€</sup> Temperatura real de la leche que pasa por los tubos cortos.

<sup>β</sup> Termografía infrarroja promedio del colector de leche.

<sup>⊖</sup> Termografía infrarroja máxima del colector de leche.

#### 4.4.2 Variables de temperatura como herramienta de diagnóstico para detectar mastitis.

La temperatura real de la leche a través de los tubos cortos presentó un valor de >38.42 °C para los cuartos mamarios con mastitis ( $\geq 200 \times 10^3$  cel.ml<sup>-1</sup>). Utilizando este valor como punto de corte se determinaron los parámetros de diagnóstico predictivo. Presentando una habilidad, para detectar mastitis (sensibilidad) de 43.39 %. Para no detectar casos de mastitis (especificidad) de 58.33 %. Para que en los cuarto enfermos se detecte una temperatura mayor a la del punto de corte (valor predicho positivo) 43.49% y para que en los cuartos saludables no se detecte una temperatura mayor a la del punto de corte (valor predicho negativo) 58.33% (Tabla 11).

Se determinó como punto de corte valores entre 32.50 a 34.14 °C para los cuartos mamarios que presentaron  $RCS \geq 200 \times 10^3$  cél.ml<sup>-1</sup> para las variable de termografía infrarroja tanto en los tubos cortos como en el colector de la máquina de ordeño. La TIRT, TIRMxT, TIRC y TIRMxC presentaron valores de sensibilidad de 48.00, 46.42, 48.20 y 50.00%, respectivamente; especificidad de 47.80, 47.80, 52.00 y 47.80%, respectivamente; valor predicho

positivo 42.85, 41.90, 45.00 y 43.75%, respectivamente y valores predichos negativos de 53.20, 52.00, 55.00 y 54.00%, respectivamente (Tabla 11).

**Tabla 11. Parámetros predictivos de diagnóstico de las variables de temperatura y la prueba de mastitis californiana CMT.**

| Variables                  | Punto de corte ><br>200 x 10 <sup>3</sup> cél.ml <sup>-1</sup> | Parámetros predictivos de diagnóstico (%) |               |                   |                   |
|----------------------------|--|---|---------------|-------------------|-------------------|
|                            |  | Sensibilidad                              | Especificidad | VP + <sup>ω</sup> | VP - <sup>κ</sup> |
| <b>TrealT</b> <sup>α</sup> | >38.42°C   | 43.39                                     | 58.33         | 43.39             | 58.33             |
| <b>TIRT</b> <sup>ε</sup>   | >33.62°C   | 48.00                                     | 47.80         | 42.85             | 53.20             |
| <b>TIRMxT</b> <sup>Σ</sup> | >34.14°C   | 46.42                                     | 47.80         | 41.90             | 52.00             |
| <b>TIRC</b> <sup>•</sup>   | >32.50°C   | 48.20                                     | 52.00         | 45.00             | 55.00             |
| <b>TIRMxC</b> <sup>ê</sup> | >33.09 °C  | 50.00                                     | 47.80         | 43.75             | 54.00             |
| <b>CMT</b> <sup>σ</sup>    | > 0 <sup>£</sup>   | 78.90                                     | 94.00         | 91.80             | 94.40             |

<sup>ω</sup> Valor predicho positivo

<sup>κ</sup> Valor predicho negativo

<sup>α</sup> Temperatura real de la leche a través de tubos cortos

<sup>ε</sup> Termografía infrarroja promedio de tubos cortos.

<sup>Σ</sup> Termografía infrarroja máxima de los tubos cortos

<sup>•</sup> Termografía infrarroja promedio del colector de la unidad de ordeño

<sup>ê</sup> Termografía infrarroja máxima del colector de la unidad de ordeño

<sup>σ</sup> Prueba de mastitis californiana con sus siglas en ingles CMT

<sup>£</sup> Valor de la prueba de CMT correspondiente aún resultado >200,000 células/ml

Con respecto a la prueba de CMT, los parámetros de diagnóstico predictivo, utilizado como punto de corte un valor >0 para animales con mastitis ( $RCS \geq 200 \times 10^3 \text{ cél.ml}^{-1}$ ) fueron los siguientes: sensibilidad de 78.79%, especificidad de 94.00%, un valor predicho positivo de 91.80% y un valor predicho negativo de 94.40%.

Según nuestro conocimiento la temperatura real de la leche como diagnóstico para detectar casos de mastitis no ha sido documentada previamente. En la presente investigación los valores de diagnóstico fueron bajos, a penas entre un 43.39 a 58.33%. La TrealT presentó valores de diagnóstico bajos debido a que no tuvo una correlación significativa con el RLCS  $r = -0.03$  ( $P = 0.76$ ). En adición, se encontraron variables con las que sí correlacionó significativamente. Estas fueron, el nivel de producción de leche  $r = 0.27$  ( $P=0.005$ ) y temperatura rectal  $r = 0.45$  ( $P<0.0001$ ), las cuales pudieron causar una variación en la temperatura de la leche y provocar diagnósticos falsos positivos (Tabla 12). Las variables mencionadas anteriormente tuvieron un

efecto sobre la temperatura de la leche debido al alto grado de vascularidad que presenta la glándula mamaria (West *et al.*, 1999) y al aumentar el metabolismo y la temperatura corporal, este aumento pudo causar que la temperatura de la leche aumentara.

En lo que concierne a la TIR, esto se ha utilizado como herramienta para detectar mastitis utilizando como objetivo de imagen la ubre de la vaca. Polat y colaboradores (2010) reportaron los parámetros de diagnóstico para el uso de TIR presentado una sensibilidad, especificidad, valor predicho positivo y negativo de 95.6, 93.6, 95 y 93.6% respectivamente. Estos resultados fueron mayores a los presentados en esta investigación, debido a que en ese estudio, aclimataron los animales en un cuarto oscuro y a una temperatura ambiental controlada (18 a 23 °C) durante un periodo de 30 min. Esta aclimatización se realizó para minimizar interferencias de luz, humedad y viento Polat *et al.*, (2010). En adición, en la presente investigación se encontró que la temperatura real de la leche se correlacionó ( $P < 0.0001$ ) con la temperatura rectal (Tabla 12) y esta a su vez con factores climáticos, lo cual pudo haber influenciado a una variación en la temperatura de la leche debido a la alta vascularidad que tiene la glándula mamaria (West *et al.*, 1999), Estos factores pudieron influenciar los valores de los parámetros diagnóstico predictivo reportados en el presente estudio, los cuales tuvieron un amplitud de variación de 43.39 a 58.33%.

Los parámetros de diagnóstico predictivo utilizando la prueba de CMT presentaron valores altos de sensibilidad (78.90%), especificidad (94.00%), valor predicho positivo (91.80%) y valor predicho negativo (94.40%); los cuales fueron similares a los reportados por Polat y colaboradores (2010); (*i.e.*, sensibilidad 88.9%, especificidad 98.9%, valores predichos positivos 99.2% y valores predichos negativos de 86.1%). En el 2013 Fosgate *et al.* reportaron una sensibilidad y especificidad de 94.7% y 77.7% respectivamente, para CMT. Sin embargo,

Sargeant *et al.* (2001) encontraron que los valores de sensibilidad para detectar infecciones intramamarias causadas por patógenos mayores y menores utilizando la prueba de CMT, fueron de 66.7% y 49.5% respectivamente. De esta manera la prueba de CMT es una herramienta que presenta una mayor confiabilidad para detectar casos de mastitis comparada con la TIR, debido a que la prueba de CMT no depende de la temperatura de la leche sino específicamente del RCS.

#### 4.4.3 Correlaciones entre variables de temperatura

La TrealT presentó una correlación positiva con coeficientes de correlación de  $r = 0.23$  ( $P = 0.013$ ) y  $r = 0.22$  ( $P = 0.015$ ) para las variables de TIRT y TIRMxT, respectivamente (Tabla 12). La correlación entre la TrealT y la TIRT fue baja debido a que la TIRT presentó una correlación con el tiempo de ordeño  $r = 0.40$  ( $P < 0.0001$ ) y con la hora a la que se realizó el ordeño  $r = 0.69$  ( $P < 0.0001$ ) (Tabla 12). Es decir que la TIRT va a aumentar a medida que el tiempo de ordeño sea mayor. En adición, la TIRT y TIRMxT fueron correlacionadas con variables como la temperatura ambiental  $r = 0.72$  ( $P < 0.0001$ ) y humedad  $r = 0.63$  ( $P < 0.0001$ ) (Tabla 12). Estas correlaciones fueron altas ya que la temperatura de los tubos de ordeño fue diferente significativamente dependiendo de a qué hora se haya tomado la imagen TIR (Anejo 11). En adición, la TrealT no presentó correlaciones significativas con las variables climáticas, esto se debe a que la leche mientras pasa a través de los tubos cortos de la unidad de ordeño no es influenciada por la temperatura ambiental y humedad durante el ordeño. Sin embargo, la TrealT presentó una correlación positiva con la temperatura rectal  $r = 0.45$  ( $P < 0.0001$ ). Esta correlación alta es debido a que la glándula mamaria tiene un alta vascularidad (West *et al.*, 1999). Por lo tanto, la temperatura de la leche se ve afectada considerablemente por la temperatura rectal del animal. En adición la TrealT presentó una correlación positiva con la producción de leche  $r = 0.27$  ( $P < 0.005$ ), esta correlación se explica puesto que a mayor producción el animal, mayor es

el metabolismo generado y esto puede causar un aumento en temperatura del animal, y debido a la vascularidad de la glándula mamaria se incrementa la temperatura de la leche. En una investigación realizada por Igono y colaboradores (1985), la temperatura de leche aumentó según aumenta el nivel de producción. Cuando el nivel de producción era de 6.1 kg de leche la temperatura de leche fue de 37.4°C y cuando aumentó la producción a 15.9 kg la temperatura de la leche aumento a 39.1°C.

Por otra parte, la TrealT no presentó una correlación ( $P > 0.13$ ) con la TIRC de la unidad de ordeño. Sin embargo, la TIRC y TIRMxC presentaron correlaciones con un valor  $r = 0.84$  y  $0.89$  ( $P < 0.0001$ ) (TIRT) y  $r = 0.85$  y  $0.90$  ( $P < 0.0001$ ) (TIRMxT). Además, la TIRC y TIRMxC presentaron una correlación con el tiempo de ordeño  $r = 0.21$  y  $0.27$  ( $P < 0.05$ ). En adición, la TIRC y TIRMxC presentaron correlaciones con la temperatura ambiental  $r = 0.79$  y  $0.82$  ( $P < 0.0001$ ) y con la humedad  $r = -0.68$  y  $-0.73$  ( $P < 0.0001$ ). Estas correlaciones son altas debido a que el colector estaba expuesto a agua y a contacto con desecho orgánicos (heces u orina) y esto pudo causar variaciones en la temperatura infrarroja. En resumen, las variables de TrealT, las variables de TIR de los tubos de leche y de los componentes de la máquina de ordeño no presentaron una correlación significativa con el RLCS, RCS y CMT presentando correlaciones con rangos de  $r = -0.03$  a  $0.17$ . Esto se debe principalmente a que las variables de temperatura fueron afectadas por variables climáticas (humedad y temperatura ambiental) y por las variables de desempeño como la temperatura rectal (Tabla 12).

**Tabla 12. Correlaciones simples entre las variables de temperaturas y todas las demás variables analizadas.**

| Variables         | Variables de Temperatura |         |        |         |       |         |       |         |       |         |
|-------------------|--------------------------|---------|--------|---------|-------|---------|-------|---------|-------|---------|
|                   | TIRT                     |         | TrealT |         | TIRMT |         | TIRMC |         | TIRC  |         |
|                   | r                        | Valor-P | r      | Valor-P | r     | Valor-P | r     | Valor-P | r     | Valor-P |
| <b>RLCS</b>       | 0.15                     | 0.1082  | -0.03  | 0.7673  | 0.11  | 0.22    | 0.17  | 0.0619  | 0.11  | 0.2477  |
| <b>CMT</b>        | 0.08                     | 0.3667  | 0.03   | 0.7046  | 0.06  | 0.5163  | 0.11  | 0.2336  | 0.08  | 0.3657  |
| <b>Tordeño</b>    | 0.40                     | <.0001  | 0.38   | <.0001  | 0.40  | <.0001  | 0.27  | 0.0041  | 0.21  | 0.026   |
| <b>Hordeño</b>    | 0.69                     | <.0001  | 0.07   | 0.4420  | 0.70  | <.0001  | 0.79  | <.0001  | 0.75  | <.0001  |
| <b>TIRT</b>       | 1.00                     | -       | 0.23   | 0.013   | 0.98  | <.0001  | 0.89  | <.0001  | 0.84  | <.0001  |
| <b>TrealT</b>     | 0.23                     | 0.013   | 1.00   | -       | 0.22  | 0.0151  | 0.15  | 0.0941  | 0.14  | 0.137   |
| <b>TIRMxT</b>     | 0.98                     | <.0001  | 0.22   | 0.0151  | 1.00  | -       | 0.90  | <.0001  | 0.85  | <.0001  |
| <b>TRectal</b>    | 0.58                     | <.0001  | 0.45   | <.0001  | 0.59  | <.0001  | 0.57  | <.0001  | 0.59  | <.0001  |
| <b>TIRMxC</b>     | 0.89                     | <.0001  | 0.15   | 0.0941  | 0.90  | <.0001  | 1.00  | -       | 0.96  | <.0001  |
| <b>TIRC</b>       | 0.84                     | <.0001  | 0.14   | 0.137   | 0.85  | <.0001  | 0.96  | <.0001  | 1.00  | -       |
| <b>Producción</b> | -0.04                    | 0.7143  | 0.27   | 0.0055  | 0.01  | 0.9392  | 0.00  | 0.9846  | 0.06  | 0.5051  |
| <b>Actividad</b>  | -0.15                    | 0.1584  | -0.03  | 0.8124  | -0.14 | 0.2323  | -0.16 | 0.1513  | -0.13 | 0.2507  |
| <b>Descanso</b>   | -0.01                    | 0.9388  | -0.16  | 0.1418  | -0.02 | 0.8712  | -0.02 | 0.8811  | 0.00  | 0.9939  |
| <b>Tambiental</b> | 0.72                     | <.0001  | 0.14   | 0.1167  | 0.74  | <.0001  | 0.82  | <.0001  | 0.79  | <.0001  |
| <b>Hrord</b>      | -0.63                    | <.0001  | -0.18  | 0.0542  | -0.66 | <.0001  | -0.73 | <.0001  | -0.68 | <.0001  |
| <b>ITHord</b>     | 0.71                     | <.0001  | 0.11   | 0.2444  | 0.73  | <.0001  | 0.81  | <.0001  | 0.79  | <.0001  |

RLCS = Recuento lineal de células somáticas

CMT = Prueba de mastitis californiana

Tordeño = Tiempo que duro el ordeño.vaca<sup>-1</sup>

Hordeño = Hora a la que se realizó el ordeño

TIRT = Termografía infrarroja promedio de los tubos cortos

TrealT = Temperatura real de la leche a través del tubo corto

TIRMxT = Termografía infrarroja máxima de los tubos cortos

Trectal = Temperatura rectal

TIRMxC = Termografía infrarroja máxima del colector

TIRC = Termografía infrarroja promedio del colector

Producción = Producción de leche (kg.ordeño<sup>-1</sup>)

Tambiental = Temperatura ambiental

HR= Humedad Relativa

ITH= Índice de temperatura humedad

#### 4.4.4 Parámetros asociados con el grado de mastitis

Los parámetros asociados al grado de mastitis fueron: recuento lineal de células somáticas (**RLCS**), prueba de mastitis californiana (**CMT**), transformación logarítmica de unidades formadoras de colonia (**LnUFC**). Estas variables fueron clasificadas en tres grupos de acuerdo al RCS-bajo, RCS-intermedio y RCS-alto. Al transformar el RCS a RLCS los valores fueron de:  $1.04 \pm 0.15$  ( $23 \times 10^3$  a  $29 \times 10^3$  cél.ml<sup>-1</sup>),  $4.82 \pm 0.30$  ( $283 \times 10^3$  a  $430 \times 10^3$  cél.ml<sup>-1</sup>) y  $7.14 \pm 0.22$  ( $1,500 \times 10^3$  –  $1,986 \times 10^3$  cél.ml<sup>-1</sup>) para el grupo RCS-bajo, RCS-intermedio y RCS-alto, respectivamente (Tabla 13).

Los valores de CMT presentaron resultados según el RCS-bajo, RCS-intermedio y RCS-alto de,  $0.07 \pm 0.09$  (0) = 0 a  $200 \times 10^3$  cél.ml<sup>-1</sup>,  $0.8 \pm 0.17$  (trazas) =  $200 \times 10^3$  a  $400 \times 10^3$  cél.ml<sup>-1</sup> y  $2.27 \pm 0.13$  (1) =  $400 \times 10^3$  a  $1,200 \times 10^3$  cél.ml<sup>-1</sup>, respectivamente. La prueba de CMT presentó resultados significativamente diferentes ( $P < 0.001$ ) para cada grupo de clasificación (Tabla 11). Con respecto a la diferencia de CMT para cada grupo de clasificación, esta se debe a que esta prueba tiene la capacidad de estimar indirectamente el RCS (Viguiet *et al.*, 2009), ya que esta degrada las paredes celulares de las células somáticas y expone su ADN formando un gel el cual de acuerdo a su viscosidad será el resultado (Schalm y Noorlander 1957), además, no es influenciado por factores climáticos.

Con respecto a los valores de LnUFC, estos fueron diferentes ( $P < 0.001$ ) entre cada grupo de clasificación: RCS-bajo ( $0.79 \pm 0.51$  LnUFC.ml<sup>-1</sup>), RCS-intermedio ( $4.25 \pm 0.915$  LnUFC.ml<sup>-1</sup>) y RCS-alto ( $4.90 \pm 0.68$  LnUFC.ml<sup>-1</sup>) (Tabla 13). El grupo con RCS-bajo fue el que menor LnUFC presentó. Esto se debe a que estos animales no presentaban una infección. Sin embargo, para los otros dos grupos de clasificación el valor de LnUFC fue de 4.25 y 4.90 LnUFC.ml<sup>-1</sup>. La razón por la cual no se encontró diferencias entre los grupos de RCS intermedio y alto, puede ser a que los animales que presentaron un alto RCS, eran aquellos animales que ya estaban bajo un tratamiento para controlar mastitis y esto pudo influenciar que se disminuya la carga bacteriana (LnUFC). Aunque por otra parte, puede ser que las bacterias encontradas en las muestras de leche específicamente no se encontraban en la glándula mamaria, ya que estas podrían estar en el canal del pezón o en el exterior de la ubre puesto que estas son las primeras líneas de defensa en contra de la infección (Sordillo *et al.*, 1997). Paradis y colaboradores (2010) mencionan que algunas bacterias son patógenos normales de la ubre o del canal del pezón y es difícil saber si en realidad las UFC son de origen de una infección intramamaria, lo cual puede causar de falsos positivos al

momento de dar un diagnóstico. En adición, Paradis y colaboradores (2010) mencionaron que el uso de  $>1,000 \text{ UFC.ml}^{-1}$  ( $6.90 \text{ lnUFC.ml}^{-1}$ ) como punto de referencia de mastitis en cultivo puro es muy bajo para ser considerado como un indicador confiable y viceversa. Sin embargo, los valores en la presente investigación para animales con mastitis fueron de 4.25 y 4.90  $\text{lnUFC.ml}^{-1}$ .

**Tabla 13. Evaluación de los promedios  $\pm$  error estándar de los parámetros asociados grado de mastitis dependiendo del recuento de células somáticas.**

| Variables                              | Categorización según el RCS ( $\text{células.ml}^{-1}$ ) $\cdot 10^3$ |    |                                       |    |                              |    | Valor- <i>P</i> |
|--|---|----|---------------------------------------|----|------------------------------|----|-----------------|
|  | Bajo<br><200  | n  | Intermedio<br>$\geq 200$ a $\leq 750$ | n  | Alto<br>>750                 | n  |                 |
| RLCS <sup>a</sup>                      | 1.04 <sup>c</sup> $\pm$ 0.15  | 72 | 4.82 <sup>b</sup> $\pm$ 0.30          | 20 | 7.14 <sup>a</sup> $\pm$ 0.22 | 37 | <0.001          |
| CMT <sup><math>\sigma</math></sup>     | 0.07 <sup>c</sup> $\pm$ 0.09  | 72 | 0.80 <sup>b</sup> $\pm$ 0.17          | 20 | 2.27 <sup>a</sup> $\pm$ 0.13 | 37 | <0.001          |
| LnUFC <sup><math>\epsilon</math></sup> | 0.79 $\pm$ 0.51 <sup>b</sup>  | 45 | 4.25 $\pm$ 0.91 <sup>a</sup>          | 15 | 4.90 $\pm$ 0.68 <sup>a</sup> | 26 | <0.001          |

Diferentes letras son significativamente diferentes.

<sup>a</sup> Recuento lineal de células somáticas.

<sup>$\sigma$</sup>  Prueba de mastitis californiana con sus siglas en ingles CMT.

<sup>$\epsilon$</sup>  Transformación Logarítmica de unidades formadoras de colonias.

#### 4.4.5 Correlaciones de los parámetros asociados del grado de mastitis

La correlación entre RLCS y LnUFC presentó un valor de  $r = 0.46$  ( $P < 0.05$ ), lo cual quiere decir que a medida que aumenta los RLCS las UFC también se incrementan (Tabla 14). Esto se debe a que al existir mayor infección o cantidad de bacterias (UFC) se observará un aumento en células inmunes para erradicar la infección intramamaria (Oviedo-Boyso *et al.*, 2007). En relación a la prueba de CMT, se encontraron valores de correlación positiva con el RLCS con un valor  $r = 0.71$  ( $P < 0.0001$ ) (Tabla 14). Daniel y colaboradores (1966) reportaron la correlación entre la prueba de CMT y conteo de leucocitos en muestras de leche, presentado un coeficiente de correlación de 0.81 demostrando que la prueba de CMT es un indicador eficiente de mastitis.

En relación al LnUFC (cantidad de bacterias) para evaluar mastitis, esta presentó correlaciones con el RLCS  $r = 0.46$  ( $P < 0.0001$ ), con CMT  $r = 0.35$  ( $P = 0.001$ ) y con el tipo de patógeno  $r = 0.56$  ( $P < 0.0001$ ) (Tabla 14). Los resultados de las correlaciones con RLCS y CMT

se debe principalmente a que al existir un mayor número de bacterias que produzcan la infección la cantidad de células somáticas será mayor (Oviedo-Boyso *et al.*, 2007). En adición Oliveira y colaboradores (2013) observaron una correlación de 0.47 entre UFC y RCS en muestras de leche de ovejas.

Por otro lado, de Haas y colaboradores (2002) reportaron que el RCS va a variar dependiendo del tipo de patógeno que cause la infección, esta variación en RCS se debe al comportamiento de la bacteria la cual puede aumentar o disminuir las unidades formadoras de colonias. Estos comportamientos fueron descritos en (de Haas *et al.*, 2004) *Escherichia coli* la cual fue significativamente asociada con pequeños aumentos de RCS, *S. aureus* fue asociado con un gran incremento de RCS, mientras que *Streptococcus spp.* no fue asociado con un patrón definido de comportamiento de RCS.

**Tabla 14. Correlaciones simples entre los parámetros asociados al grado de mastitis y todas las variables analizadas.**

| Variables       | Parámetros asociados al grado de mastitis |         |      |         |       |         |
|-----------------|---|---------|------|---------|-------|---------|
|                 | RLCS                                      |         | CMT  |         | LnUFC |         |
|                 | r   | Valor-P | r    | Valor-P | r     | Valor-P |
| <b>RLCS</b>     | 1.00                                      | -       | 0.71 | <.0001  | 0.46  | <.0001  |
| <b>CMT</b>      | 0.71                                      | <.0001  | 1.00 | -       | 0.35  | 0.0019  |
| <b>TIRT</b>     | 0.15                                      | 0.1082  | 0.08 | 0.3667  | 0.12  | 0.3138  |
| <b>TrealT</b>   | -0.03                                     | 0.7673  | 0.03 | 0.7046  | 0.04  | 0.7222  |
| <b>TIRMxT</b>   | 0.11                                      | 0.22    | 0.06 | 0.5163  | 0.08  | 0.4898  |
| <b>TRectal</b>  | 0.10                                      | 0.2719  | 0.09 | 0.3373  | 0.04  | 0.7408  |
| <b>TIRMxC</b>   | 0.17                                      | 0.0619  | 0.11 | 0.2336  | 0.01  | 0.9045  |
| <b>TIRC</b>     | 0.11                                      | 0.2477  | 0.08 | 0.3657  | -0.03 | 0.7786  |
| <b>LnUFC</b>    | 0.46                                      | <.0001  | 0.35 | 0.0019  | 1.00  | -       |
| <b>Patógeno</b> | 0.12                                      | 0.3052  | 0.09 | 0.4156  | 0.56  | <.0001  |

RLCS = Recuento lineal de células somáticas

CMT = Prueba de mastitis californiana

TIRT = Termografía infrarroja promedio de los tubos cortos

TrealT = Temperatura real de la leche a través del tubo corto

TIRMxT = Termografía infrarroja máxima de los tubos cortos

Trectal = Temperatura rectal

TIRMxC = Termografía infrarroja máxima del colector

TIRC = Termografía infrarroja promedio del colector

LnUFC = Logaritmo natural de UFC

Patógeno = Patógeno mastítico

#### 4.4.6 Variables de desempeño animal

Las variables de desempeño animal incluidas en el análisis estadístico fueron: DEL, producción de leche (kg/ordeño) y temperatura rectal del animal (°C). Cada variable fue categorizada por grupos de clasificación según RCS-bajo, RCS-intermedio y RCS-alto. Los DEL no fueron diferentes ( $P=0.84$ ) entre los grupos de clasificación de RCS presentado promedios  $\pm$  error estándar de DEL de  $115 \pm 8$ ,  $112 \pm 16$  y  $107 \pm 12$  días para el grupo según RCS-bajo, RCS-intermedio y RCS-alto, respectivamente (Tabla 15). Lo mencionado anteriormente muestra que los grupos según RCS estaban uniformizados para los DEL. De esta manera, al no haber diferencias entre grupos nos permitiría eliminar el efecto de cambios en producción de leche. Puesto a que en otras investigaciones, Silvestre y colaboradores (2009) analizaron resultados de 95,405 lactaciones y reportaron un producción de leche a los  $48 \pm 8$  días de 27.6 kg y al final de la lactación a los  $344 \pm 4$  días de 13.4 kg. En la presente investigación los DEL fueron uniformes para que los resultados de producción se dieran por efecto de la mastitis y no a causa de los DEL.

La producción de leche por ordeño, fue significativamente diferente ( $P < 0.002$ ) para cada grupo de clasificación según el RCS; siendo mayor en el grupo de RCS-bajo ( $10.95 \pm 0.33$  kg de leche; Tabla 15). Sin embargo, no se encontraron diferencias en producción de leche entre los grupos de RCS-intermedio y RCS-alto con una producción promedio de  $7.75 \pm 0.64$  y  $8.62 \pm 0.49$  kg/ordeño, respectivamente (Tabla 15). Estos resultados concuerdan con los reportados por Hand y colaboradores (2012) donde las pérdidas de leche incrementaron significativamente cuando se aumentaba el RCS ya que en animales con RCS  $200 \times 10^3$  cel.ml<sup>-1</sup> se reportaron pérdidas de 0.35 a 1.09 kg.día<sup>-1</sup> y en animales con  $2,000 \times 10^3$  cél.ml<sup>-1</sup> el rango de pérdida de leche fue de 1.49 a 4.70 kg/día. En adición, en la presente investigación se encontró una correlación negativa entre producción y RLCS  $r = -0.24$  ( $P = 0.0125$ ), es decir que a medida que

disminuía la producción de leche el RLCS aumentaba (Tabla 16). Esto concuerda con la investigación de Hinrichs y colaboradores (2005), donde reportaron una correlación negativa  $r = -0.29$  entre mastitis y producción de leche. La reducción en la síntesis de leche se debe a que cuartos mamarios con elevados RCS presentan daños al tejido secretor, y ocasionan que la lactosa escape (Reneau, 1986; Kehrlí y Shuster, 1994; Schukken *et al.*, 2003).

La temperatura rectal no fue diferente ( $P=0.13$ ) entre los grupos de clasificación según el RCS con promedios  $\pm$  error estándar de temperatura rectal de  $38.33 \pm 0.05$ ,  $38.24 \pm 0.09$  y  $38.46 \pm 0.07^\circ\text{C}$  para RCS-bajo, RCS-intermedio, RCS-alto, respectivamente (Tabla 15). Las temperaturas observadas representan el cuadro clínico de una mastitis del tipo sub-clínica; la cual está caracterizada por la ausencia de síntomas como aumento en temperatura rectal (Plastridge, 1958; Harmon, 1994). Adicionalmente, la temperatura rectal correlacionó positivamente con la TrealT  $r = 0.45$  ( $P < 0.001$ ) y con la TIR de los tubos cortos y colector de la unidad de ordeño  $r = 0.58$  y  $0.59$  ( $P < 0.001$ ) (Tabla 16). Esto indica que a medida que incrementa la temperatura rectal va a aumentar la TrealT y por ende la TIR de los componentes de la unidad de ordeño, esto debido a la alta vascularidad que presenta la glándula mamaria (Igono *et al.*, 1985; West *et al.*, 1999). Además, la temperatura rectal se correlacionó ( $P < 0.001$ ) con las variables climáticas (temperatura ambiental, HR y ITH) con coeficientes de correlación (0.61, -0.57 y 0.57, respectivamente) (Tabla 16). Kabuga (1992) reportó que las variables climáticas (temperatura ambiental y humedad) explicaban hasta un 59.6% de las variaciones en temperatura rectal.

En adición, la temperatura rectal presentó una correlación negativa con los DEL  $r = -0.27$  ( $P < 0.004$ ) (Tabla 16). Este comportamiento se podría deber a que el promedio de DEL de los animales incluidos en este estudio ( $113 \pm 6$ ) era mayor al pico de producción normal en el ganado lechero bovino el ocurre a los 40 a 60 días después del parto (Hutjens, 2007). Según avanza la

lactancia luego del pico de producción, la vaca produce menos volumen de leche y por ende disminuye su tasa metabólica y por consecuencia su temperatura corporal (Silvestre *et al.*, 2009) y por lo tanto hay una menor producción de calor por parte del animal (Kadzere *et al.*, 2002).

**Tabla 15. Evaluación de los promedios  $\pm$  error estándar de las variables de producción según el recuento de células somáticas.**

| Variables                | Categorización según el RCS (células.ml <sup>-1</sup> ) · 10 <sup>3</sup> |    |                          |    |                          |    | Valor-P |
|--------------------------|---|----|--------------------------|----|--------------------------|----|---------|
|                          | <200  | n  | ≥200 a ≤750              | n  | >750                     | n  |         |
| DEL (días) <sup>α</sup>  | 115 ± 8   | 67 | 112 ± 16                 | 18 | 107 ± 12                 | 31 | 0.84    |
| Prod (kg) <sup>σ</sup>   | 10.95 ± 0.33 <sup>a</sup>   | 67 | 7.75 ± 0.64 <sup>b</sup> | 18 | 8.62 ± 0.49 <sup>b</sup> | 31 | 0.0022  |
| T rectal °C <sup>Σ</sup> | 38.33 ± 0.05  | 69 | 38.24 ± 0.09             | 20 | 38.46 ± 0.07             | 36 | 0.13    |

α Días en leche.

σ Producción de leche por ordeño

Σ Temperatura rectal de los animales en °C

Promedios con diferentes letras son significativamente diferentes.

**Tabla 16. Correlaciones simples entre los parámetros desempeño animal y variables analizadas.**

| Variables  | Parámetros de desempeño animal |         |            |         |         |         |           |         |          |         |
|------------|--------------------------------|---------|------------|---------|---------|---------|-----------|---------|----------|---------|
|            | DEL                            |         | Producción |         | Trectal |         | Actividad |         | Descanso |         |
|            | r                              | Valor-P | r          | Valor-P | r       | Valor-P | r         | Valor-P | r        | Valor-P |
| RLCS       | -0.07                          | 0.4516  | -0.24      | 0.0125  | 0.10    | 0.2719  | 0.02      | 0.8319  | 0.01     | 0.9282  |
| RCS        | -0.09                          | 0.3578  | -0.18      | 0.0693  | 0.09    | 0.3059  | -0.10     | 0.3652  | -0.11    | 0.2965  |
| CMT        | -0.15                          | 0.1287  | -0.03      | 0.758   | 0.09    | 0.3373  | 0.12      | 0.2721  | -0.13    | 0.2479  |
| Tordeño    | -0.08                          | 0.4135  | 0.31       | 0.0015  | 0.21    | 0.0281  | -0.21     | 0.0642  | -0.11    | 0.3452  |
| TIRT       | -0.11                          | 0.2385  | -0.04      | 0.7143  | 0.58    | <.0001  | -0.15     | 0.1584  | -0.01    | 0.9388  |
| TrealT     | -0.18                          | 0.0666  | 0.27       | 0.0055  | 0.45    | <.0001  | -0.03     | 0.8124  | -0.16    | 0.1418  |
| TIRMxT     | -0.09                          | 0.336   | 0.01       | 0.9392  | 0.59    | <.0001  | -0.14     | 0.2     | -0.02    | 0.8712  |
| TRectal    | -0.27                          | 0.004   | 0.09       | 0.3518  | 1.00    | -       | -0.15     | 0.1586  | -0.21    | 0.0487  |
| TIRMxC     | -0.06                          | 0.5487  | 0.00       | 0.9846  | 0.57    | <.0001  | -0.16     | 0.1513  | -0.02    | 0.8811  |
| TIRC       | -0.01                          | 0.9469  | 0.06       | 0.5051  | 0.59    | <.0001  | -0.13     | 0.2507  | 0.00     | 0.9939  |
| DEL        | 1.00                           | -       | 0.17       | 0.0778  | -0.27   | 0.004   | 0.01      | 0.9536  | 0.72     | <.0001  |
| Producción | 0.17                           | 0.0778  | 1.00       | -       | 0.09    | 0.3518  | -0.18     | 0.0947  | -0.16    | 0.1389  |
| Actividad  | 0.01                           | 0.9536  | -0.18      | 0.0947  | -0.15   | 0.1586  | 1.00      | -       | 0.03     | 0.7601  |
| Descanso   | 0.72                           | <.0001  | -0.16      | 0.1389  | -0.21   | 0.0487  | 0.03      | 0.7601  | 1.00     | -       |
| Tambiental | -0.23                          | 0.0166  | -0.16      | 0.1045  | 0.61    | <.0001  | -0.22     | 0.0418  | -0.14    | 0.1956  |
| HR         | 0.24                           | 0.0139  | 0.08       | 0.3835  | -0.57   | <.0001  | 0.18      | 0.0917  | 0.27     | 0.0116  |
| ITH        | -0.20                          | 0.0378  | -0.17      | 0.0758  | 0.57    | <.0001  | -0.22     | 0.0462  | -0.07    | 0.5089  |

RLCS= Recuento lineal de células somáticas

RCS= Recuento de células somáticas

CMT= Prueba de mastitis californiana

Tordeño= Tiempo que duró el ordeño

TIRT= Termografía infrarroja promedio de los tubos cortos

TrealT= Temperatura real de la leche a través del tubo corto

TIRMxT= Termografía infrarroja máxima de los tubos cortos

Trectal = Temperatura rectal

TIRMxC = Termografía infrarroja máxima colector

TIRC = Termografía infrarroja promedio del colector

DEL= Días en leche

Producción = Producción de leche (kg.ordeño<sup>-1</sup>)

Tambiental= Temperatura ambiental

HR= Humedad relativa

ITH= índice de temperatura humedad

#### 4.4.7 Efecto de patógenos mastíticos

La prevalencia de patógenos mastíticos en la presente investigación con 94 cuartos mamarios analizados fue: casos negativos (60.63%), *Estafilococos coagulasa negativo (ECN)* (15.96%), *Estafilococos aureus (S. aureus*, por sus siglas en inglés) (4.26%), *Estreptococos (E.) ambientales* (2.13%), Coliformes (2.13), *Bacilo Gram positivo* (2.13%), *Pseudomonas* (2.13%) y otros patógenos (2.13%) (Figura 2). El tipo de patógenos encontrados fueron que comúnmente se reportan. Algunos autores (Wilson *et al.*, 1997; Barkema *et al.*, 1998; Bradley, 2002) mencionan que cerca del 75 - 80% de los casos de mastitis son causados por; coliformes, *E. ambientales*; *S. aureus*, y *ECN*.

**Figura 2. Prevalencia de patógenos mastíticos en un hato lechero comercial en Puerto Rico.**



Los parámetros evaluadores del grado de mastitis (LnUFC y RLCS) fueron diferentes ( $P < 0.0001$  y  $P = 0.0007$ , respectivamente) según el tipo de patógeno. Para el LnUFC, *Bacilo G+*, coliformes y *ECN* fueron los que presentaron mayores promedios  $\pm$  error estándar  $9.77 \pm 1.17$ ,  $7.65 \pm 1.17$  y  $7.552 \pm 0.43$  LnUFC, respectivamente. Para el RLCS, *Pseudomonas* fue el que presentó el mayor promedio  $\pm$  desviación estándar de RLCS ( $7.68 \pm 1.83$  RLCS.ml<sup>-1</sup>) y *E. ambientales*, casos negativos y contaminados fueron los que presentaron los menores promedios

± error estándar de RLCS 1.64±1.82, 2.83±0.34 y 2.60±0.91 RLCS.ml<sup>-1</sup>, respectivamente. Mientras que la TrealT, TIRT y TIRMxT no fueron significativamente diferentes ( $P > 0.05$ ) entre los patógenos mastíticos (Tabla 17). En adición, las correlaciones entre RLCS con TIRT presentó un valor de  $r = 0.84$  ( $P = 0.0086$ ) y con TIRMxT presentó un valor  $r = 0.73$  ( $P = 0.0364$ ) (Tabla 18).

**Tabla 17. Parámetros evaluadores de mastitis y variables de temperatura real e infrarroja según el patógeno mastítico**

| Patógeno              | n  | LnUFC <sup>€</sup>      | RLCS <sup>£</sup>       | TrealT <sup>α</sup> | TIRT <sup>κ</sup> | TIRMxT <sup>Σ</sup> |
|-----------------------|----|-------------------------|-------------------------|---------------------|-------------------|---------------------|
| <i>Bacilo G+</i>      | 2  | 9.77±1.17 <sup>a</sup>  | 7.14±1.83 <sup>ab</sup> | 38.35±1.04          | 34.60±2.02        | 34.7±1.93           |
| <i>ECN</i>            | 15 | 7.55±0.43 <sup>a</sup>  | 4.78±0.67 <sup>b</sup>  | 37.29±0.39          | 32.67±0.52        | 33.05±0.50          |
| <b>Coliformes</b>     | 2  | 7.65±1.17 <sup>a</sup>  | 5.11±1.83 <sup>ab</sup> | 38.90±1.04          | 34.15±1.43        | 34.65±1.36          |
| <b>Contaminados</b>   | 8  | 2.66±0.58 <sup>b</sup>  | 2.60±0.91 <sup>c</sup>  | 37.32±0.52          | 31.86±0.71        | 32.49±0.68          |
| <i>E. ambientales</i> | 2  | 5.64±1.17 <sup>ab</sup> | 1.64±1.82 <sup>c</sup>  | 38.2±1.04           | 32.70±1.43        | 33.55±1.36          |
| <b>Negativo</b>       | 57 | 0.00±0.00 <sup>c</sup>  | 2.83±0.34 <sup>c</sup>  | 37.95±0.20          | 32.72±0.27        | 33.26±0.27          |
| <i>Pseudomonas</i>    | 2  | 6.47±1.17 <sup>ab</sup> | 7.68±1.83 <sup>a</sup>  | 38.40±1.04          | 34.15±1.43        | 34.4±1.36           |
| <i>S. aureus</i>      | 4  | 5.93±0.83 <sup>ab</sup> | 6.95±1.29 <sup>ab</sup> | 37.37±0.74          | 33.90±1.00        | 34.23±0.96          |
| <b>Otros</b>          | 2  | 9.77±1.17 <sup>a</sup>  | 7.35±1.83 <sup>a</sup>  | 38.50±1.48          | 30.55±1.43        | 30.75±1.37          |
| <b>Valor - P</b>      |    | <0.0001                 | 0.0007                  | 0.7022              | 0.4416            | 0.4304              |

Diferentes letras son significativamente diferentes.

€ Transformación logarítmica de unidades formadoras de colonias

£ Recuento lineal de células somáticas.

α Temperatura real de la leche a través de los tubos cortos.

κ Termografía infrarroja promedio de los tubos cortos.

Σ Termografía infrarroja máxima de los tubos cortos.

**Tabla 18. Correlaciones de los promedios de parámetros evaluadores del grado de mastitis y variables de temperatura real e infrarroja de los patógenos.**

|                           | <b>RLCS</b> | <b>LnUFC</b> | <b>TrealT</b> | <b>TIRT</b> | <b>TIRMxT</b> |
|---------------------------|-------------|--------------|---------------|-------------|---------------|
| <b>RLCS<sup>£</sup></b>   | 1.00000     | 0.62269      | 0.19516       | 0.84274     | 0.73853       |
|                           | -           | 0.0992       | 0.6433        | 0.0086      | 0.0364        |
| <b>LnUFC<sup>€</sup></b>  |             | 1.00000      | 0.34016       | 0.68182     | 0.65703       |
|                           |             | -            | 0.4097        | 0.0625      | 0.0767        |
| <b>TrealT<sup>α</sup></b> |             |              | 1.00000       | 0.62129     | 0.71541       |
|                           |             |              | -             | 0.10000     | 0.046         |
| <b>TIRT<sup>Σ</sup></b>   |             |              |               | 1.00000     | 0.98061       |
|                           |             |              |               | -           | <.0001        |

Nota: Los valores presentados son los coeficientes de correlación de Pearson sobre sus respectivos niveles de significancia.

£ Recuento lineal de células somáticas.

€ Transformación logarítmica de unidades formadoras de colonias.

α Temperatura real de muestras de leche.

€ Termografía infrarroja promedio de los tubos cortos.

Σ Termografía infrarroja máxima de los tubos cortos.

#### 4.4.8 Modelo para predecir el recuento lineal de células somáticas

No se pudo determinar un modelo significativo para predecir el RLCS a partir de la temperatura de la leche ni con la temperatura infrarroja de los componentes de la unidad de ordeño debido a que no se presentó una correlación entre el RLCS con TrealT  $r = -0.03$  ( $P = 0.76$ ), TIRT  $r = 0.15$  ( $P = 0.108$ ) y TIRC  $r = 0.11$  ( $P = 0.24$ ). Esto explica que el RLCS en el presente estudio no influenció la temperatura real de la leche. Sin embargo si se observó que la temperatura real de la leche fue influenciada considerablemente por factores como la temperatura rectal del animal ( $0.45$ ;  $P < 0.0001$ ). En adición, la temperatura infrarroja de los componentes de la unidad de ordeño se vio influenciada por el tiempo de ordeño y por las variables climáticas. Lo mencionado anteriormente ocasionó que los modelos para predecir RLCS utilizando temperatura real y la TIR de componente de la unidad de ordeño junto a las variables climáticas solo explicarían 4 - 6 % ( $R^2$  ajustado) de la variación del RLCS.

## 4.5 Conclusiones y recomendaciones

### **Conclusiones:**

- La TIR explica entre un 14 a 23 % la variación de los datos de la Temperatura real de la leche a través de los tubos cortos.
- La variación de los datos de temperatura infrarroja de los componentes de la máquina de ordeño se vio influenciada en un 72 a 82% por la temperatura ambiental, -63 a -82% por la humedad relativa y un 40% por variaciones diurnas durante proceso de ordeño.
- Los parámetros predictivos de diagnóstico de las imágenes termográficas infrarrojas de los componentes de la máquina de ordeño presentaron amplitud de valores de sensibilidad, especificidad, valor predicho positivo y valor predicho negativo de 46.42 a 50.00%, 47.80 a 52.00%, 41.90 a 45.00% y 52.00 a 55.00%, respectivamente.
- Los modelos de análisis predictivo para estimar el RLCS a partir de la temperatura de la leche y de la temperatura infrarroja de los componentes de la máquina de ordeño solo explicaron entre una 4 a 6% de la variación de los datos.
- La variación de los datos de temperatura real de la leche a través de los tubos cortos se explicaba en un 45 % por la temperatura rectal de animal.
- La variación de los datos de la temperatura rectal de los animales fue explicada en un 61 % por la temperatura ambiental y un -57% por la humedad relativa.

### **Recomendaciones**

- Realizar la toma de datos bajo condiciones climáticas similares, es decir dentro un mismo periodo de tiempo, para de esta manera evitar variación en los valores de temperatura infrarroja ocasionados por la temperatura ambiental.

- Aumentar el número de observaciones (muestras) por patógenos, para de esta manera mejorar la distribución de los datos y poder compararlos.

## 5 CONCLUSIONES GENERALES

- La temperatura de las muestras de leche se vio afectada por las variables climáticas (temperatura ambiental y humedad relativa), y causó que el utilizarla como herramienta de detección de mastitis no es útil.
- La temperatura real de la leche a través del tubo corto se vio influenciada por la temperatura rectal que presentó el animal y esta a su vez se vio afectada por cambios en las variables de temperatura ambiental y humedad relativa. La temperatura infrarroja de los componentes de la máquina de ordeño se vio influenciada por el tiempo de ordeño y por la temperatura ambiental y humedad relativa. Esto causó la posibilidad de que se presentaran falsos positivos para detectar mastitis utilizando la temperatura real de la leche y la temperatura infrarroja de los componentes de la máquina de ordeño.
- Los parámetros de diagnóstico predictivo, sensibilidad, especificidad, valor predicho positivo y valor predicho negativo para la temperatura de las muestra de leche fue de 48, 46, 44.6 y 50% respectivamente; para la termografía infrarroja de muestras de leche fue de 56.66, 52.22, 51 y 57% respectivamente.
- Los parámetros de diagnóstico predictivo, sensibilidad, especificidad, valor predicho positivo y valor predicho negativo para la temperatura real de la leche a través de los tubos cortos fueron de 43.39, 58.33, 43.39 y 58.33% respectivamente. Para la termografía infrarroja de los componentes de la máquina de ordeño presentaron amplitud de valores de 46.42 a 50.00%, 47.80 a 52.00%, 41.90 a 45.00%, 52.00 a 55.00% respectivamente.

## 6 BIBLIOGRAFÍA

- Aggarwal, A., Upadhyay, R., 2013. Thermoregulation, in: *Heat Stress and Animal Productivity*. Springer India, pp. 1–25.
- Aljumaah, R.S., Samara, E.M., Ayadi, M., 2012. Influence of introducing machine milking on biothermal parameters of lactating camels (*Camelus dromedarius*). *Ital. J. Anim. Sci.* 11, e73.
- Alsaad, M., Büscher, W., 2012. Detection of hoof lesions using digital infrared thermography in dairy cows. *J. Dairy Sci.* 95, 735–742.
- Andersen, S., Dohoo, I.R., Olde Riekerink, R., Stryhn, H., 2010. Diagnosing intramammary infections: Evaluating expert opinions on the definition of intramammary infection using conjoint analysis. *J. Dairy Sci.* 93, 2966–2975.
- Antonelli, M., Di Fraia, M., Carrato, S., Cautero, G., Menk, R.H., Jark, W.H., Ganbold, T., Biasiol, G., Callegari, C., Coreno, M., De Sio, A., Pace, E., 2013. Fast synchrotron and FEL beam monitors based on single-crystal diamond detectors and InGaAs/InAlAs quantum well devices. *Nucl. Instrum. Methods Phys. Res. Sect. Accel. Spectrometers Detect. Assoc. Equip., Proceedings of the 9th International Conference on Radiation Effects on Semiconductor Materials Detectors and Devices October 9-12 2012 Dipartimento di Fisica e Astronomia - Sezione di Astronomia e Scienza dello Spazio - Largo Enrico Fermi, 2, 50125 Firenze Organized by: Università degli Studi di Firenze with the support of Istituto Nazionale di Fisica Nucleare 730*, 164–167.
- Ariznabarreta, A., Gonzalo, C., San Primitivo, F., 2002. Microbiological Quality and Somatic Cell Count of Ewe Milk with Special Reference to Staphylococci. *J. Dairy Sci.* 85, 1370–1375.
- Astarita, T., Carlomagno, G.M., 2012. *Infrared Thermography for Thermo-Fluid-Dynamics*. Springer Science & Business Media.
- Astrov, Y.A., Portsel, L.M., Lodygin, A.N., Shuman, V.B., Abrosimov, N.V., 2009. Planar sulfur-doped silicon detectors for high-speed infrared thermography. *Infrared Phys. Technol.* 52, 25–31.
- Auld, M., 2011. Milk Quality and Udder Health | Effect on Processing Characteristics, in: Fuquay, J.W. (Ed.), *Encyclopedia of Dairy Sciences (Second Edition)*. Academic Press, San Diego, pp. 902–907.
- Bagavathiappan, S., Lahiri, B.B., Saravanan, T., Philip, J., Jayakumar, T., 2013. Infrared thermography for condition monitoring – A review. *Infrared Phys. Technol.* 60, 35–55.
- Bannerman, D., Paape, M.J., Lee, J.-W., Zhao, X., Hope, J.C., Rainard, P., 2004. *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* Elicit Differential Innate Immune Responses following Intramammary Infection. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 11, 463–472.
- Barbano, D.M., Ma, Y., Santos, M.V., 2006. Influence of Raw Milk Quality on Fluid Milk Shelf Life. *J. Dairy Sci.* 89, E15–E19.
- Bar, D., Tauer, L.W., Bennett, G., González, R.N., Hertl, J.A., Schukken, Y.H., Schulte, H.F., Welcome, F.L., Gröhn, Y.T., 2008. The cost of generic clinical mastitis in dairy cows as estimated by using dynamic programming. *J. Dairy Sci.* 91, 2205–2214.
- Barkema, H.W., Schukken, Y.H., Lam, T.J.G.M., Beiboer, M.L., Wilmink, H., Benedictus, G., Brand, A., 1998. Incidence of Clinical Mastitis in Dairy Herds Grouped in Three Categories by Bulk Milk Somatic Cell Counts. *J. Dairy Sci.* 81, 411–419.

- Barnum, D.A., Newbould, F.H.S., 1961. The Use of the California Mastitis Test for the Detection Of Bovine Mastitis. *Can. Vet. J.* 2, 83–90.
- Barreiro, J.R., Ferreira, C.R., Sanvido, G.B., Kostrzewa, M., Maier, T., Wegemann, B., Böttcher, V., Eberlin, M.N., dos Santos, M.V., 2010. Short communication: Identification of subclinical cow mastitis pathogens in milk by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *J. Dairy Sci.* 93, 5661–5667.
- Berry, R.J., Kennedy, A.D., Scott, S.L., Kyle, B.L., Schaefer, A.L., 2003. Daily variation in the udder surface temperature of dairy cows measured by infrared thermography: Potential for mastitis detection. *Can. J. Anim. Sci.* 83, 687–693.
- Bitman, J., Lefcourt, A., Wood, D.L., Stroud, B., 1984. Circadian and ultradian temperature rhythms of lactating dairy cows. *J. Dairy Sci.* 67, 1014–1023.
- Bitman, J., Wood, D.L., Bright, S.A., Miller, R.H., Capuco, A.V., Roche, A., Pankey, J.W., 1991. Lipid Composition of Teat Canal Keratin Collected Before and After Milking from Holstein and Jersey Cows. *J. Dairy Sci.* 74, 414–420.
- Blosser, T.H., 1979. Economic Losses from and the National Research Program on Mastitis in the United States. *J. Dairy Sci.* 62, 119–127.
- Bohmanova, J., Misztal, I., Cole, J.B., 2007. Temperature-Humidity Indices as Indicators of Milk Production Losses due to Heat Stress. *J. Dairy Sci.* 90, 1947–1956.
- Bouraoui, R., Lahmar, M., Majdoub, A., Djemali, M., Belyea, R., 2002. The relationship of temperature-humidity index with milk production of dairy cows in a Mediterranean climate. *Anim. Res.* 51, 479–491.
- Bradley, A.J., 2002. Bovine Mastitis: An Evolving Disease. *Vet. J.* 164, 116–128.
- Brandt, M., Haeussermann, A., Hartung, E., 2010. Invited review: Technical solutions for analysis of milk constituents and abnormal milk. *J. Dairy Sci.* 93, 427–436.
- Brolund, L., 1985. Cell counts in bovine milk. Causes of variation and applicability for diagnosis of subclinical mastitis. *Acta Vet. Scand. Suppl.* 80, 1–123.
- Bruckmaier, R.M., Ontsouka C. E., Blum J. W., 2004. Fractionized milk composition in dairy cows with subclinical mastitis. *Int. J. Vet. Biomed. Sci.* 49, 283–290.
- Carroll, E.J., Schalm, O.W., 1962. Effect of Deoxyribonuclease on the California Test for Mastitis. *J. Dairy Sci.* 45, 1094–1097.
- Castro-Costa, A., Caja, G., Salama, A.A.K., Rovai, M., Flores, C., Aguiló, J., 2014. Thermographic variation of the udder of dairy ewes in early lactation and following an *Escherichia coli* endotoxin intramammary challenge in late lactation. *J. Dairy Sci.* 97, 1377–1387.
- Cheung, A.L., Bayer, A.S., Zhang, G., Gresham, H., Xiong, Y.-Q., 2004. Regulation of virulence determinants in vitro and in vivo in *Staphylococcus aureus*. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 40, 1–9.
- Chinchali, J.F., Kaliwal, B.B., 2014. Histopathology of mammary gland in *Staphylococcus aureus* induced mastitis in mice. *Asian Pac. J. Trop. Dis.* 4, Supplement 1, S320–S325.
- Colak, A., Polat, B., Okumus, Z., Kaya, M., Yanmaz, L.E., Hayirli, A., 2008. Short Communication: Early Detection of Mastitis Using Infrared Thermography in Dairy Cows. *J. Dairy Sci.* 91, 4244–4248.
- Curbelo-Rodríguez, J.E., 2007. Relación entre los recuentos de células somáticas, prácticas de manejo y patógenos causantes de mastitis en hatos lecheros de Puerto Rico. Tesis M.S. Universidad de Puerto Rico.

- Curbelo-Rodríguez, J.E., 2011. Biophotonic imaging as a novel approach to study infectious diseases in the bovine. ProQuest, UMI Dissertation Publishing.
- Daniel, R.C., Smith, G.C., Barnum, D.A., 1966. The relationship of California mastitis test (C.M.T.) scores with leucocyte counts on bucket milk samples. *Can. Vet. J.* 7, 80–83.
- De Haas, Y., Barkema, H.W., Veerkamp, R.F., 2002. The Effect of Pathogen-Specific Clinical Mastitis on the Lactation Curve for Somatic Cell Count. *J. Dairy Sci.* 85, 1314–1323.
- De Haas, Y., Veerkamp, R.F., Barkema, H.W., Gröhn, Y.T., Schukken, Y.H., 2004. Associations Between Pathogen-Specific Cases of Clinical Mastitis and Somatic Cell Count Patterns. *J. Dairy Sci.* 87, 95–105.
- De Vliegher, S., Fox, L.K., Piepers, S., McDougall, S., Barkema, H.W., 2012. Invited review: Mastitis in dairy heifers: Nature of the disease, potential impact, prevention, and control. *J. Dairy Sci.* 95, 1025–1040.
- Dickrell Jim, 2011. Top Producer Magazine 400,000 Somatic Cell Count Proposal Fails <http://www.agweb.com/news/> (accessed 1.23.14).
- Di Rienzo, J.A., Casanoves, F., Balzarine, M.G., Gonzalez, L., Tablada, M., Robledo, C.W., 2014. InfoStat versión 2011. Grupo InfoStat, FCA, Córdoba, Argentina.
- Dohoo, I.R., Leslie, K.E., 1991. Evaluation of changes in somatic cell counts as indicators of new intramammary infections. *Prev. Vet. Med.* 10, 225–237.
- Dohoo, I.R., Meek, A.H., 1982. Somatic Cell Counts in Bovine Milk. *Can. Vet. J.* 23, 119–125.
- Dong, F., Hennessy, D.A., Jensen, H.H., 2012. Factors determining milk quality and implications for production structure under somatic cell count standard modification. *J. Dairy Sci.* 95, 6421–6435.
- Dufour, S., Fréchette, A., Barkema, H.W., Mussell, A., Scholl, D.T., 2011. Invited review: Effect of udder health management practices on herd somatic cell count. *J. Dairy Sci.* 94, 563–579.
- Eddy, A., Van Hoogmoed, L., Snyder, J., 2001. The Role of Thermography in the Management of Equine Lameness. *Vet. J.* 162, 172–181.
- El Zubeir, I.E.M., ElOwni, O.A.O., Mohamed, G.E., 2005. Effect of mastitis on macro-minerals of bovine milk and blood serum in Sudan. *J. S. Afr. Vet. Assoc.* 76, 22–25.
- Emanuelson, U., Funke, H., 1991. Effect of Milk Yield on Relationship Between Bulk Milk Somatic Cell Count and Prevalence of Mastitis. *J. Dairy Sci.* 74, 2479–2483.
- Erdei, A., 2004. Regulation of mast cell activation by complement-derived peptides. *Immunol. Lett.* 92, 39–42.
- Ferguson, J.D., Azzaro, G., Gambina, M., Licitra, G., 2007. Prevalence of Mastitis Pathogens in Ragusa, Sicily, from 2000 to 2006. *J. Dairy Sci.* 90, 5798–5813.
- FLIR, A., 2014. The Ultimate Infrared Handbook for R&D Professionals [http://www.flir.com/uploadedFiles/Thermography/MMC/Brochures/T559243/T559243\\_APAC.pdf](http://www.flir.com/uploadedFiles/Thermography/MMC/Brochures/T559243/T559243_APAC.pdf) (accessed 5.19.14).
- Fordham, D.P., McCarthy, T.T., Rowlinson, P., 1987. An evaluation of milk temperature measurement for detecting oestrus in dairy cattle. I. Factors affecting measurement of milk temperature. *Vet. Res. Commun.* 11, 367–379.
- Fosgate, G.T., Petzer, I.M., Karzis, J., 2013. Sensitivity and specificity of a hand-held milk electrical conductivity meter compared to the California mastitis test for mastitis in dairy cattle. *Vet. J.* 196, 98–102.
- Frenzel, L., Hermine, O., 2013. Mast cells and inflammation. *Joint Bone Spine* 80, 141–145.

- Galanzha, E.I., Zharov, V.P., 2012. Photoacoustic flow cytometry. *Methods, Flow Cytometry and Cell Sorting: the Next Generation* 57, 280–296.
- Gao, J., Yu, F.-Q., Luo, L.-P., He, J.-Z., Hou, R.-G., Zhang, H.-Q., Li, S.-M., Su, J.-L., Han, B., 2012. Antibiotic resistance of *Streptococcus agalactiae* from cows with mastitis. *Vet. J.* 194, 423–424.
- Garcia Barreno P., 2008. Inflamación. *Rev. Real Acad. Cienc. Exactas Físicas Nat.* 102, 91 – 159.
- Geary, U., Lopez-Villalobos, N., Begley, N., McCoy, F., O'Brien, B., O'Grady, L., Shalloo, L., 2012. Estimating the effect of mastitis on the profitability of Irish dairy farms. *J. Dairy Sci.* 95, 3662–3673.
- Gillespie, B.E., Headrick, S.I., Boonyayatra, S., Oliver, S.P., 2009. Prevalence and persistence of coagulase-negative *Staphylococcus* species in three dairy research herds. *Vet. Microbiol., Special Issue: Heifer and CNS Mastitis* 134, 65–72.
- Gomez, I., Foudi, N., Longrois, D., Norel, X., 2013. The role of prostaglandin E2 in human vascular inflammation. *Prostaglandins Leukot. Essent. Fat. Acids PLEFA* 89, 55–63.
- Gonzalo, C., Boixo, J.C., Carriedo, J.A., San Primitivo, F., 2004. Evaluation of Rapid Somatic Cell Counters Under Different Analytical Conditions in Ovine Milk. *J. Dairy Sci.* 87, 3623–3628.
- Gonzalo, C., Linage, B., Carriedo, J.A., de la Fuente, F., Primitivo, F.S., 2006. Evaluation of the Overall Accuracy of the DeLaval Cell Counter for Somatic Cell Counts in Ovine Milk. *J. Dairy Sci.* 89, 4613–4619.
- Green, L.E., Schukken, Y.H., Green, M.J., 2006. On distinguishing cause and consequence: Do high somatic cell counts lead to lower milk yield or does high milk yield lead to lower somatic cell count? *Prev. Vet. Med.* 76, 74–89.
- Gunasekera, T., 2003. Potential for broad applications of flow cytometry and fluorescence techniques in microbiological and somatic cell analyses of milk. *Int. J. Food Microbiol.* 85, 269–279.
- Guo, R.-F., Ward, P.A., 2005. Role of C5a in inflammatory responses. *Annu. Rev. Immunol.* 23, 821–852.
- Hagnestam-Nielsen, C., Emanuelson, U., Berglund, B., Strandberg, E., 2009. Relationship between somatic cell count and milk yield in different stages of lactation. *J. Dairy Sci.* 92, 3124–3133.
- Halasa, T., Huijps, K., Østerås, O., Hogeveen, H., 2007. Economic effects of bovine mastitis and mastitis management: A review. *Vet. Q.* 29, 18–31.
- Hand, K.J., Godkin, A., Kelton, D.F., 2012. Milk production and somatic cell counts: A cow-level analysis. *J. Dairy Sci.* 95, 1358–1362.
- Hanuš, O., Sojková, K., Hanušová, K., Samková, E., Hronek, M., Hyšpler, R., Kopecký, J., Jedelská, R., 2011. An experimental comparison of methods for somatic cell count determination in milk of various species of mammals. *Acta Univ Agric Etsilvic Medel Brun LIX*, 67–82.
- Harmon, R.J., 1994. Physiology of Mastitis and Factors Affecting Somatic Cell Counts. *J. Dairy Sci.* 77, 2103–2112.
- Hezme, M.N.M., Shiels, I.A., Rolfe, B.E., Mills, P.C., 2012. Complement C5a: Impact on the field of veterinary medicine. *Vet. J.* 192, 264–271.

- Hinrichs, D., Stamer, E., Junge, W., Kalm, E., 2005. Genetic Analyses of Mastitis Data Using Animal Threshold Models and Genetic Correlation with Production Traits. *J. Dairy Sci.* 88, 2260–2268.
- Hoffmann, G., Schmidt, M., Ammon, C., Rose-Meierhöfer, S., Burfeind, O., Heuwieser, W., Berg, W., 2013. Monitoring the body temperature of cows and calves using video recordings from an infrared thermography camera. *Vet. Res. Commun.* 37, 91–99.
- Hogeveen, H., 2005. Mastitis in Dairy Production: Current Knowledge and Future Solutions. Wageningen Academic Pub.
- Hosseinzadeh, S., Dastmalchi Saei, H., 2014. Staphylococcal species associated with bovine mastitis in the North West of Iran: Emerging of coagulase-negative staphylococci. *Int. J. Vet. Sci. Med.*
- Hovinen, M., Siivonen, J., Taponen, S., Hänninen, L., Pastell, M., Aisla, A.-M., Pyörälä, S., 2008. Detection of Clinical Mastitis with the Help of a Thermal Camera. *J. Dairy Sci.* 91, 4592–4598.
- Hunt, P.R., Olejnik, N., Sprando, R.L., 2012. Toxicity ranking of heavy metals with screening method using adult *Caenorhabditis elegans* and propidium iodide replicates toxicity ranking in rat. *Food Chem. Toxicol.* 50, 3280–3290.
- Hurnik, J.F., Boer, S.D., Webster, A.B., 1984. Detection of Health Disorders in Dairy Cattle Utilizing a Thermal Infrared Scanning Technique. *Can. J. Anim. Sci.* 64, 1071–1073.
- Hutjens, M.F., 2007. Managing Physiological Curves For Peak Milk <http://livestocktrail.illinois.edu/uploads/dairynet/papers/Managing%20Physiological%20Curves%20For%20Peak%20Milk.pdf> (accessed 10.16.14).
- Igono, M.O., Johnson, H.D., Steevens, B.J., Krause, G.F., Shanklin, M.D., 1987. Physiological, productive, and economic benefits of shade, spray, and fan system versus shade for Holstein cows during summer heat. *J. Dairy Sci.* 70, 1069–1079.
- Igono, M.O., Steevens, B.J., Shanklin, M.D., Johnson, H.D., 1985. Spray Cooling Effects on Milk Production, Milk, and Rectal Temperatures of Cows During a Moderate Temperate Summer Season. *J. Dairy Sci.* 68, 979–985.
- International Federation Dairy, (IDF), 1995. Enumeration of somatic cells. FIL-IDF Standard no. 148A. *Mastit. Newsl.* 20.
- Janeway, C.A., Medzhitov, R., 2002. Innate Immune Recognition. *Annu. Rev. Immunol.* 20, 197–216.
- Janzen, J.J., 1970. Economic Losses Resulting from Mastitis. A Review. *J. Dairy Sci.* 53, 1151–1160.
- Jones, G.M., Pearson, R.E., Clabaugh, G.A., Heald, C.W., 1984. Relationships Between Somatic Cell Counts and Milk Production. *J. Dairy Sci.* 67, 1823–1831.
- Kabuga, J.D., 1992. The influence of thermal conditions on rectal temperature, respiration rate and pulse rate of lactating Holstein-Friesian cows in the humid tropics. *Int. J. Biometeorol.* 36, 146–150.
- Kadzere, C., Murphy, M., Silanikove, N., Maltz, E., 2002. Heat stress in lactating dairy cows: a review. *Livest. Prod. Sci.* 77, 59–91.
- Kay, S.J., Collis, K.A., Anderson, J.C., Grant, A.J., 1977. The effect of intergroup movement of dairy cows on bulk-milk somatic cell numbers. *J. Dairy Res.* 44, 589–593.
- Kehrli, M.E., Shuster, D.E., 1994. Factors Affecting Milk Somatic Cells and Their Role in Health of the Bovine Mammary Gland. *J. Dairy Sci.* 77, 619–627.

- Kim, J.-K., Han, C.-H., 2001. A new uncooled thermal infrared detector using silicon diode. *Sens. Actuators Phys.*, Special Issue: Micromechanics Section of Sensors and Actuators, based on contributions revised from the Technical Digest of the Thirteenth IEEE International Workshop on Micro Electro Mechanical Systems (MEMS-2000) 89, 22–27.
- Kitchen, B.J., 1981. Review of the progress of dairy science: bovine mastitis: milk compositional changes and related diagnostic tests. *J. Dairy Res.* 48, 167–188.
- Kunc, P., Knizkova, I., Prikryl, M., Maloun, J., 2007. Infrared thermography as a tool to study the milking process: a review. *Agric. Trop. Subtrop.* v. 40(1) p. 29-32.
- Laevens, H., Deluyker, H., Schukken, Y.H., De Meulemeester, L., Vandermeersch, R., De Muêlenaere, E., De Kruif, A., 1997. Influence of Parity and Stage of Lactation on the Somatic Cell Count in Bacteriologically Negative Dairy Cows. *J. Dairy Sci.* 80, 3219–3226.
- Lahiri, B.B., Bagavathiappan, S., Soumya, C., Mahendran, V., Pillai, V.P.M., Philip, J., Jayakumar, T., 2014. Infrared thermography based defect detection in ferromagnetic specimens using a low frequency alternating magnetic field. *Infrared Phys. Technol.* 64, 125–133.
- Larry, K., Hogan, J., 2001. The world of mastitis. Proceedings of the 2nd International Symposium on Mastitis and Milk Quality <http://www.nmconline.org/articles/wrldmast.htm> (accessed 4.29.14).
- Lee, S., Nam, J., Hwang, W., Kim, J., Lee, B., 2011. A study on integrity assessment of the resistance spot weld by Infrared Thermography. *Procedia Eng.*, 11th International Conference on the Mechanical Behavior of Materials (ICM11) 10, 1748–1753.
- Lescourret, F., Coulon, J.B., 1994. Modeling the Impact of Mastitis on Milk Production by Dairy Cows. *J. Dairy Sci.* 77, 2289–2301. doi:10.3168/jds.S0022-0302(94)77172-1
- Lukas, J.M., Hawkins, D.M., Kinsel, M.L., Reneau, J.K., 2005. Bulk Tank Somatic Cell Counts Analyzed by Statistical Process Control Tools to Identify and Monitor Subclinical Mastitis Incidence. *J. Dairy Sci.* 88, 3944–3952.
- Madriga, F.J., Ibarra-Castanedo, C., Conde, O.M., López-Higuera, J.M., Maldague, X., 2010. Infrared thermography processing based on higher-order statistics. *NDT E Int.* 43, 661–666.
- Martins, R.F.S., do Prado Paim, T., de Abreu Cardoso, C., Stéfano Lima Dallago, B., de Melo, C.B., Louvandini, H., McManus, C., 2012. Mastitis detection in sheep by infrared thermography. *Res. Vet. Sci.*
- Ma, Y., Ryan, C., Barbano, D.M., Galton, D.M., Rudan, M.A., Boor, K.J., 2000. Effects of Somatic Cell Count on Quality and Shelf-Life of Pasteurized Fluid Milk1. *J. Dairy Sci.* 83, 264–274.
- McArthur, A.J., Easdon, M.P., Gregson, K., 1992. Milk temperature and detection of oestrus in dairy cattle. *J. Agric. Eng. Res.* 51, 29–46.
- Mccafferty, D.J., 2007. The value of infrared thermography for research on mammals: previous applications and future directions. *Mammal Rev.* 37, 207–223.
- McFadden, M., 2011. California Mastitis Test and Milk Quality. *Mich. Dairy Rev.* 16, 1–24.
- Mehrzad, J., Desrosiers, C., Lauzon, K., Robitaille, G., Zhao, X., Lacasse, P., 2005. Proteases Involved in Mammary Tissue Damage During Endotoxin-Induced Mastitis in Dairy Cows\*. *J. Dairy Sci.* 88, 211–222.

- Metzner, M., Sauter-Louis, C., Seemueller, A., Petzl, W., Klee, W., 2014. Infrared thermography of the udder surface of dairy cattle: Characteristics, methods, and correlation with rectal temperature. *Vet. J.* 199, 57–62.
- Microbiological Procedures for the Diagnosis of Bovine Udder Infection and Determination of Milk Quality, 2004. NMC.
- Miller, R.H., Paape, M.J., Acton, J.C., 1986. Comparison of Milk Somatic Cell Counts by Coulter and Fossomatic Counters. *J. Dairy Sci.* 69, 1942–1946.
- Milner, P., Page, K.L., Walton, A.W., Hillerton, J.E., 1996. Detection of Clinical Mastitis by Changes in Electrical Conductivity of Foremilk Before Visible Changes in Milk. *J. Dairy Sci.* 79, 83–86.
- Montero González, T., Hurtado de Mendoza Amat, J., Cabrera Rosell, P., 2001. Daño múltiple de órganos: Morfología de la respuesta inflamatoria sistémica; Multiple organ failure. Morphology of systemic inflammatory response. *Rev Cuba Med Mil* 30, 77–88.
- Moon, J.S., Koo, H.C., Joo, Y.S., Jeon, S.H., Hur, D.S., Chung, C.I., Jo, H.S., Park, Y.H., 2007. Application of a New Portable Microscopic Somatic Cell Counter with Disposable Plastic Chip for Milk Analysis. *J. Dairy Sci.* 90, 2253–2259.
- Nelson, Y., 2004. Tre metoder för diagnos av mastit i fält <http://ex-epsilon.slu.se:8080/archive/00000066/> (accessed 5.18.14).
- Newman, D.J., 2013. Vasodilation, Vasodilatory Functions, in: Gellman, M.D., Turner, J.R. (Eds.), *Encyclopedia of Behavioral Medicine*. Springer New York, pp. 2029–2030.
- Nielen, M., Deluyker, H., Schukken, Y.H., Brand, A., 1992. Electrical Conductivity of Milk: Measurement, Modifiers, and Meta Analysis of Mastitis Detection Performance. *J. Dairy Sci.* 75, 606–614.
- Nielen, M., Schukken, Y.H., Brand, A., Deluyker, H.A., Maatje, K., 1995. Detection of Subclinical Mastitis from On-Line Milking Parlor Data. *J. Dairy Sci.* 78, 1039–1049.
- Nikkhah, A., Plaizier, J.C., Einarson, M.S., Berry, R.J., Scott, S.L., Kennedy, A.D., 2005. Short Communication: Infrared Thermography and Visual Examination of Hooves of Dairy Cows in Two Stages of Lactation. *J. Dairy Sci.* 88, 2749–2753.
- NMC, 2013. Contagious and Environmental Mastitis Pathogens: What is the Difference and Why Does it Matter? *Natl. Mastitis Council*. URL [http://www.nmconline.org/articles.html#anchor\\_3](http://www.nmconline.org/articles.html#anchor_3) (accessed 2.2.14).
- Norberg, E., Hogeveen, H., Korsgaard, I.R., Friggens, N.C., Sloth, K.H.M.N., Løvendahl, P., 2004. Electrical Conductivity of Milk: Ability to Predict Mastitis Status. *J. Dairy Sci.* 87, 1099–1107.
- Norman, H.D., Lombard, J.E., Wright, J.R., Koprak, C.A., Rodriguez, J.M., Miller, R.H., 2011. Consequence of alternative standards for bulk tank somatic cell count of dairy herds in the United States. *J. Dairy Sci.* 94, 6243–6256.
- Nyström, P.O., 1998. The systemic inflammatory response syndrome: definitions and aetiology. *J. Antimicrob. Chemother.* 41, 1–7.
- Olde Riekerink, R.G.M., Barkema, H.W., Stryhn, H., 2007a. The Effect of Season on Somatic Cell Count and the Incidence of Clinical Mastitis. *J. Dairy Sci.* 90, 1704–1715.
- Olde Riekerink, R.G.M., Barkema, H.W., Veenstra, W., Berg, F.E., Stryhn, H., Zadoks, R.N., 2007b. Somatic Cell Count During and Between Milkings. *J. Dairy Sci.* 90, 3733–3741.
- Oliveira, A., B, M., L, S., C, A., M, T., O, M., S, E., C, O., 2013. Mastitis and Milk Composition in First Partum Santa Ines Ewes. *J. Vet. Adv.* 3, 220.

- Oliver, S.P., Gillespie, B.E., Headrick, S.J., Lewis, M.J., Dowlen, H.H., 2004. Heifer Mastitis: prevalence, risk factors and control strategies <http://nmconline.org/articles/heifmast.pdf> (accessed 5.12.14).
- OMahony, L., Akdis, M., Akdis, C.A., 2011. Regulation of the immune response and inflammation by histamine and histamine receptors. *J. Allergy Clin. Immunol.* 128, 1153–1162.
- Ott, S.J., 1999. Costs of Herd-Level Production Losses Associated With Subclinical Mastitis in U.S. Dairy Cows. *Natl. Mastit. Coun. Annu. Meet. Proc.* 152.
- Oviedo-Boyso, J., Valdez-Alarcón, J.J., Cajero-Juárez, M., Ochoa-Zarzosa, A., López-Meza, J.E., Bravo-Patiño, A., Baizabal-Aguirre, V.M., 2007. Innate immune response of bovine mammary gland to pathogenic bacteria responsible for mastitis. *J. Infect.* 54, 399–409.
- Paradis, M.-È., Bouchard, É., Scholl, D.T., Miglior, F., Roy, J.-P., 2010. Effect of nonclinical *Staphylococcus aureus* or coagulase-negative staphylococci intramammary infection during the first month of lactation on somatic cell count and milk yield in heifers. *J. Dairy Sci.* 93, 2989–2997.
- Park, J.Y., Fox, L.K., Seo, K.S., McGuire, M.A., Park, Y.H., Rurangirwa, F.R., Sisco, W.M., Bohach, G.A., 2011. Detection of classical and newly described staphylococcal superantigen genes in coagulase-negative staphylococci isolated from bovine intramammary infections. *Vet. Microbiol.* 147, 149–154.
- Pezeshki, A., Stordeur, P., Wallemacq, H., Schynts, F., Stevens, M., Boutet, P., Peelman, L.J., De Spiegeleer, B., Duchateau, L., Bureau, F., Burvenich, C., 2011. Variation of Inflammatory Dynamics and Mediators in Primiparous Cows After Intramammary Challenge with *Escherichia Coli*. *Vet. Res.* 42, 15.
- Plastridge, W.N., 1958. Bovine Mastitis: A Review. *J. Dairy Sci.* 41, 1141–1181.
- Polat, B., Colak, A., Cengiz, M., Yanmaz, L.E., Oral, H., Bastan, A., Kaya, S., Hayirli, A., 2010. Sensitivity and specificity of infrared thermography in detection of subclinical mastitis in dairy cows. *J. Dairy Sci.* 93, 3525–3532.
- Pyörälä, S., 2003. Indicators of inflammation in the diagnosis of mastitis. *Vet. Res.* 34, 565–578.
- Rainwater-Lovett, K., Pacheco, J.M., Packer, C., Rodriguez, L.L., 2009. Detection of foot-and-mouth disease virus infected cattle using infrared thermography. *Vet. J. Lond. Engl.* 1997 180, 317–324.
- Rajala-Schultz, P.J., Torres, A.H., DeGraves, F.J., Gebreyes, W.A., Patchanee, P., 2009. Antimicrobial resistance and genotypic characterization of coagulase-negative staphylococci over the dry period. *Vet. Microbiol., Special Issue: Heifer and CNS Mastitis* 134, 55–64.
- Reneau, J.K., 1986a. Effective Use of Dairy Herd Improvement Somatic Cell Counts in Mastitis Control. *J. Dairy Sci.* 69, 1708–1720.
- Reyher, K.K., Haine, D., Dohoo, I.R., Revie, C.W., 2012. Examining the effect of intramammary infections with minor mastitis pathogens on the acquisition of new intramammary infections with major mastitis pathogens—A systematic review and meta-analysis. *J. Dairy Sci.* 95, 6483–6502. doi:10.3168/jds.2012-5594
- Rodrigues, A.C.O., Cassoli, L.D., Machado, P.F., Ruegg, P.L., 2009. Short communication: Evaluation of an on-farm test to estimate somatic cell count. *J. Dairy Sci.* 92, 990–995.
- Rogalski, A., 2011. Recent progress in infrared detector technologies. *Infrared Phys. Technol., Proceedings of the International Conference on Quantum Structure Infrared Photodetector (QSIP) 2010* 54, 136–154.

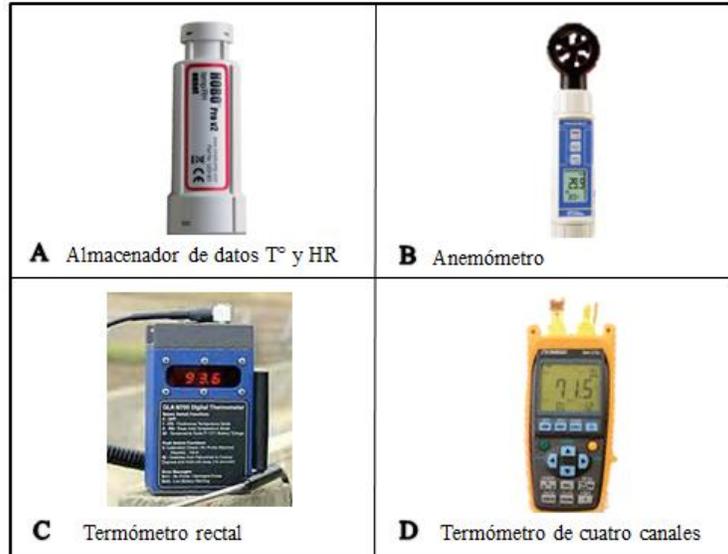
- Rosenberger, C.M., Finlay, B.B., 2003. Phagocyte sabotage: disruption of macrophage signalling by bacterial pathogens. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 4, 385–396.
- Ruegg, P.L., Tabone, T.J., 2000. The Relationship Between Antibiotic Residue Violations and Somatic Cell Counts in Wisconsin Dairy Herds. *J. Dairy Sci.* 83, 2805–2809.
- Sánchez, H., 2008. Efecto de la temperatura del aire, la radiación solar y el nivel de concentrado en la dieta sobre la temperatura vaginal bovina medida continuamente. Tesis M.S. University of Puerto Rico, Mayaguez (Puerto Rico).
- Sanford, C.J., Keefe, G.P., Sanchez, J., Dingwell, R.T., Barkema, H.W., Leslie, K.E., Dohoo, I.R., 2006. Test characteristics from latent-class models of the California Mastitis Test. *Prev. Vet. Med.* 77, 96–108.
- Santman-Berends, I.M.G.A., Olde Riekerink, R.G.M., Sampimon, O.C., van Schaik, G., Lam, T.J.G.M., 2012. Incidence of subclinical mastitis in Dutch dairy heifers in the first 100 days in lactation and associated risk factors. *J. Dairy Sci.* 95, 2476–2484.
- Santos, M.V., Ma, Y., Barbano, D.M., 2003. Effect of Somatic Cell Count on Proteolysis and Lipolysis in Pasteurized Fluid Milk During Shelf-Life Storage<sup>1</sup>. *J. Dairy Sci.* 86, 2491–2503.
- Sapru, A., Barbano, D.M., Joseph Yun, J., Klei, L.R., Oltenacu, P.A., Bandler, D.K., 1997. Cheddar Cheese: Influence of Milking Frequency and Stage of Lactation on Composition and Yield<sup>1</sup>. *J. Dairy Sci.* 80, 437–446.
- Sargeant, J.M., Leslie, K.E., Shirley, J.E., Pulkrabek, B.J., Lim, G.H., 2001. Sensitivity and Specificity of Somatic Cell Count and California Mastitis Test for Identifying Intramammary Infection in Early Lactation. *J. Dairy Sci.* 84, 2018–2024.
- SAS 9.3, 2010. SAS 9.3. SAS Institute, Inc., Cary, NC, USA.
- Schaefer, A.L., Cook, N., Tessaro, S.V., Deregt, D., Desroches, G., Dubeski, P.L., Tong, A.K.W., Godson, D.L., 2004. Early detection and prediction of infection using infrared thermography. *Can. J. Anim. Sci.* 84, 73–80.
- Schalm, O.W., Noorlander, D.O., 1957. Experiments and observations leading to development of the California mastitis test. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 130, 199–204.
- Schrick, F.N., Hockett, M.E., Saxton, A.M., Lewis, M.J., Dowlen, H.H., Oliver, S.P., 2001. Influence of Subclinical Mastitis During Early Lactation on Reproductive Parameters. *J. Dairy Sci.* 84, 1407–1412.
- Schukken, Y.H., Wilson, D.J., Welcome, F., Garrison-Tikofsky, L., Gonzalez, R.N., 2003. Monitoring udder health and milk quality using somatic cell counts. *Vet. Res.* 34, 579–596.
- Schutz, M.M., Hansen, L.B., Steuernagel, G.R., Kuck, A.L., 1990. Variation of Milk, Fat, Protein, and Somatic Cells for Dairy Cattle<sup>1</sup>. *J. Dairy Sci.* 73, 484–493.
- Sheldrake, R.F., Hoare, R.J.T., McGregor, G.D., 1983. Lactation Stage, Parity, and Infection Affecting Somatic Cells, Electrical Conductivity, and Serum Albumin in Milk. *J. Dairy Sci.* 66, 542–547.
- Shim, E.H., Shanks, R.D., Morin, D.E., 2004. Milk Loss and Treatment Costs Associated with Two Treatment Protocols for Clinical Mastitis in Dairy Cows<sup>\*,†</sup>. *J. Dairy Sci.* 87, 2702–2708.
- Silvestre, A.M., Martins, A.M., Santos, V.A., Ginja, M.M., Colaço, J.A., 2009. Lactation curves for milk, fat and protein in dairy cows: A full approach. *Livest. Sci.* 122, 308–313.
- Sordillo, L.M., 2005. Factors affecting mammary gland immunity and mastitis susceptibility. *Livest. Prod. Sci.* 98, 89–99.

- Sordillo, L.M., Shafer-Weaver, K., DeRosa, D., 1997. Immunobiology of the Mammary Gland. *J. Dairy Sci.* 80, 1851–1865.
- Spanu, C., 2010. Somatic cell count control strategies in dairy ewes.
- Spector, W.G., Willoughby, D.A., 1963. THE INFLAMMATORY RESPONSE. *Bacteriol. Rev.* 27, 117–154.
- Stevens, M.G.H., De Spiegeleer, B., Peelman, L., Boulougouris, X.J.A., Capuco, A.V., Burvenich, C., 2012. Compromised neutrophil function and bovine *E. coli* mastitis: Is C5a the missing link? *Vet. Immunol. Immunopathol.* 149, 151–156.
- Suthar, V.S., Burfeind, O., Patel, J.S., Dhami, A.J., Heuwieser, W., 2011. Body temperature around induced estrus in dairy cows. *J. Dairy Sci.* 94, 2368–2373.
- Tan, J.-H., Ng, E.Y.K., Rajendra Acharya, U., Chee, C., 2009. Infrared thermography on ocular surface temperature: A review. *Infrared Phys. Technol.* 52, 97–108.
- Theoharides, T.C., Alysandratos, K.-D., Angelidou, A., Delivanis, D.-A., Sismanopoulos, N., Zhang, B., Asadi, S., Vasiadi, M., Weng, Z., Miniati, A., Kalogeromitros, D., 2012. Mast cells and inflammation. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Basis Dis.* 1822, 21–33.
- Thorberg, B.-M., Danielsson-Tham, M.-L., Emanuelson, U., Persson Waller, K., 2009. Bovine subclinical mastitis caused by different types of coagulase-negative staphylococci. *J. Dairy Sci.* 92, 4962–4970.
- Topaloglu, N., Nieva, P.M., Yavuz, M., Huissoon, J.P., 2013. An effective thermal conductance tuning mechanism for uncooled microbolometers. *Infrared Phys. Technol.* 57, 81–88.
- Treece, J.M., Morse, G.E., Levy, C., 1966. Lipid Analyses of Bovine Teat Canal Keratin. *J. Dairy Sci.* 49, 1240–1244. U.N., 2012.
- United Nations: World Population Prospects The 2012 Revision [http://esa.un.org/wpp/Documentation/pdf/WPP2012\\_%20KEY%20FINDINGS.pdf](http://esa.un.org/wpp/Documentation/pdf/WPP2012_%20KEY%20FINDINGS.pdf) (accessed 2.2.14).
- Urech, E., Puhan, Z., Schällibaum, M., 1999. Changes in Milk Protein Fraction as Affected by Subclinical Mastitis. *J. Dairy Sci.* 82, 2402–2411.
- U.S. Department of Health and Drug Administration, 2005. Milk - M-I-05-3: Updated Official Laboratory Evaluation Forms (FDA-2400 Series) <http://www.fda.gov/Food/GuidanceRegulation/GuidanceDocumentsRegulatoryInformation/Milk/ucm075155.htm> (accessed 5.19.14).
- U.S. Department of Health and Drug Administration, 2011. Milk - Pasteurized Milk Ordinance 2011 <http://www.fda.gov/downloads/Food/GuidanceRegulation/UCM291757.pdf> (accessed 1.23.14).
- Viguier, C., Arora, S., Gilmartin, N., Welbeck, K., O’Kennedy, R., 2009. Mastitis detection: current trends and future perspectives. *Trends Biotechnol.* 27, 486–493.
- Watts, J.L., 1988. Etiological agents of bovine mastitis. *Vet. Microbiol.* 16, 41–66.
- Wellnitz, O., Bruckmaier, R.M., 2012. The innate immune response of the bovine mammary gland to bacterial infection. *Vet. J.* 192, 148–152.
- Wenz, J.R., Moore, D.A., Kasimanickam, R., 2011. Factors associated with the rectal temperature of Holstein dairy cows during the first 10 days in milk. *J. Dairy Sci.* 94, 1864–1872.
- West, J.W., Hill, G.M., Fernandez, J.M., Mandebvu, P., Mullinix, B.G., 1999. Effects of dietary fiber on intake, milk yield, and digestion by lactating dairy cows during cool or hot, humid weather. *J. Dairy Sci.* 82, 2455–2465.

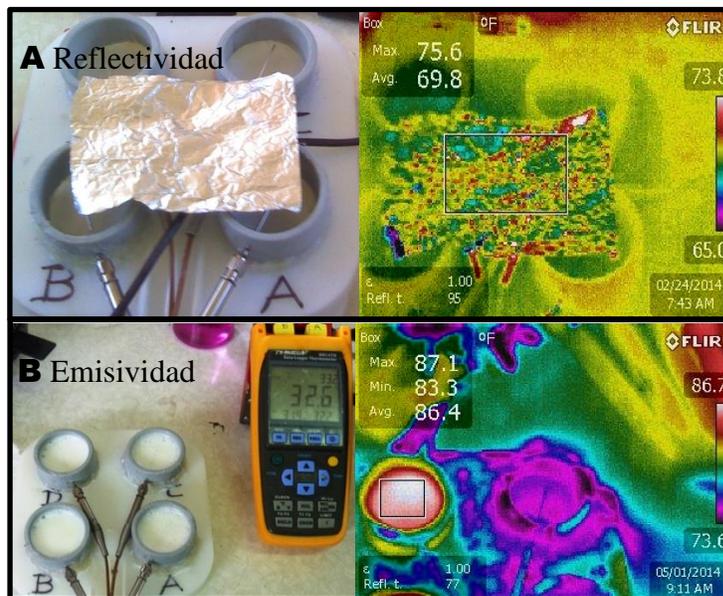
- West, J.W., Mullinix, B.G., Bernard, J.K., 2003. Effects of hot, humid weather on milk temperature, dry matter intake, and milk yield of lactating dairy cows. *J. Dairy Sci.* 86, 232–242.
- Wheeler, D., 2006. Temperature regulation. *Surg. Oxf., Orthopaedic III: injuries to the upper limb* 24, 446–451.
- Wilkins, I., Wheeler, D., 2004. Regulation of temperature. *Surg. Oxf., Breast* 22, 168a–168e.
- Willeberg, P., 1993. Bovine somatotropin and clinical mastitis: epidemiological assessment of the welfare risk. *Livest. Prod. Sci., Biotechnology and Animal Welfare* 36, 55–66.
- Wilson, D.J., Gonzalez, R.N., Das, H.H., 1997. Bovine Mastitis Pathogens in New York and Pennsylvania: Prevalence and Effects on Somatic Cell Count and Milk Production. *J. Dairy Sci.* 80, 2592–2598.
- Zerpa, H., Berhane, Y., Elliott, J., Bailey, S.R., 2010. Functional role of  $\alpha$ 2-adrenoceptor subtypes in the cooling-enhanced vasoconstriction of isolated cutaneous digital veins of the horse. *Eur. J. Pharmacol.* 627, 194–202.
- Zhang, S., Maddox, C.W., 2000. Cytotoxic Activity of Coagulase-Negative Staphylococci in Bovine Mastitis. *Infect. Immun.* 68, 1102–1108.
- Zhao, X., Lacasse, P., 2008. Mammary tissue damage during bovine mastitis: Causes and control. *J. Anim. Sci.* 86, 57–65.

## 7 ANEJOS.

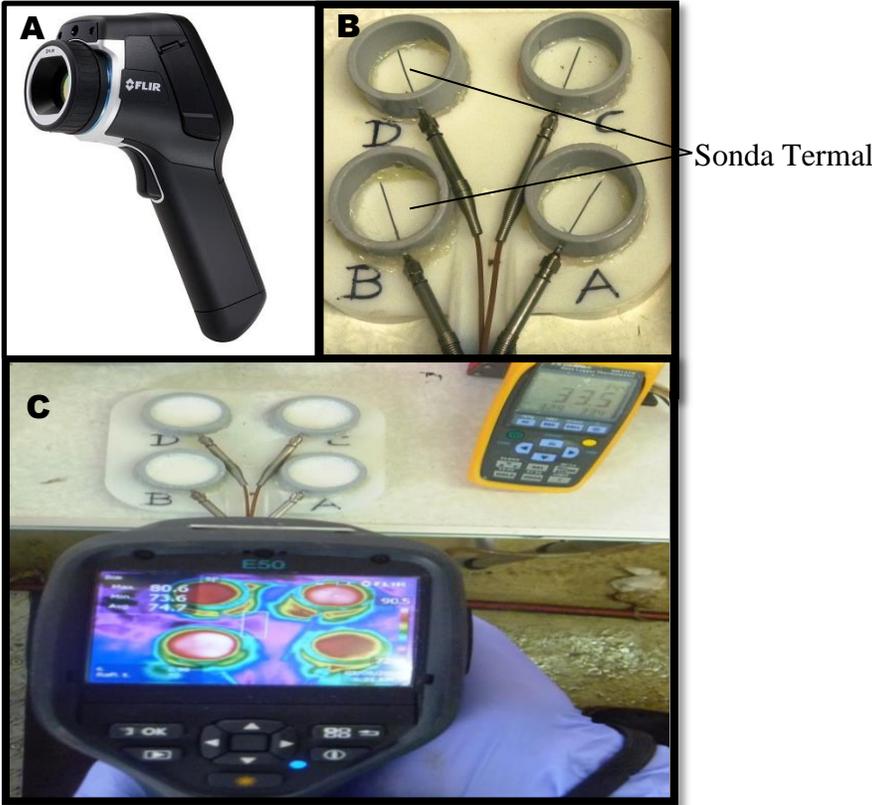
### Anejo 1. Equipos utilizados para medir las variables climáticas y temperatura rectal



### Anejo 2. Calibración de variables infrarrojas



**Anejo 3. Toma de imagen termográfica infrarroja**



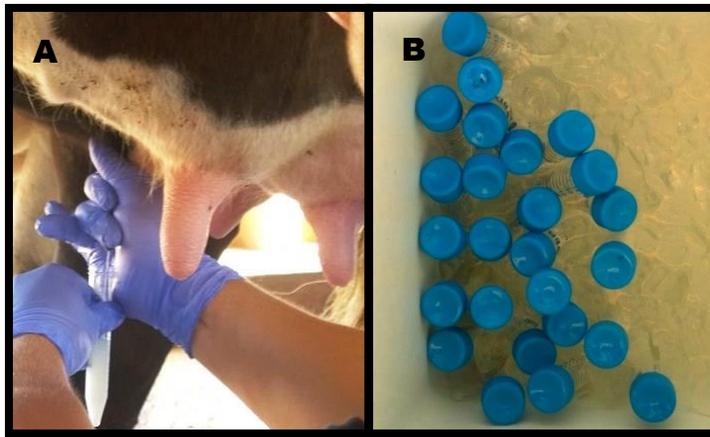
**Anejo 4. Prueba de mastitis californiana**



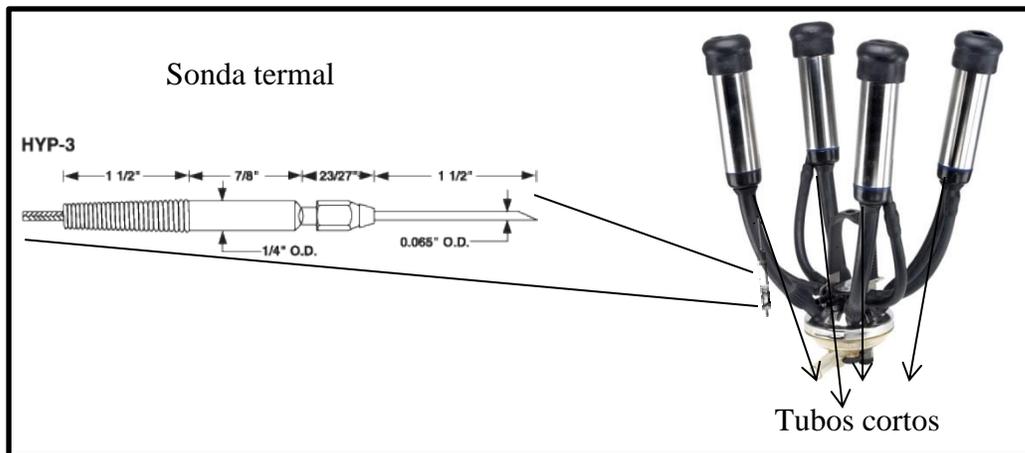
### Anejo 5. Prueba de DeLaval Cell Counter



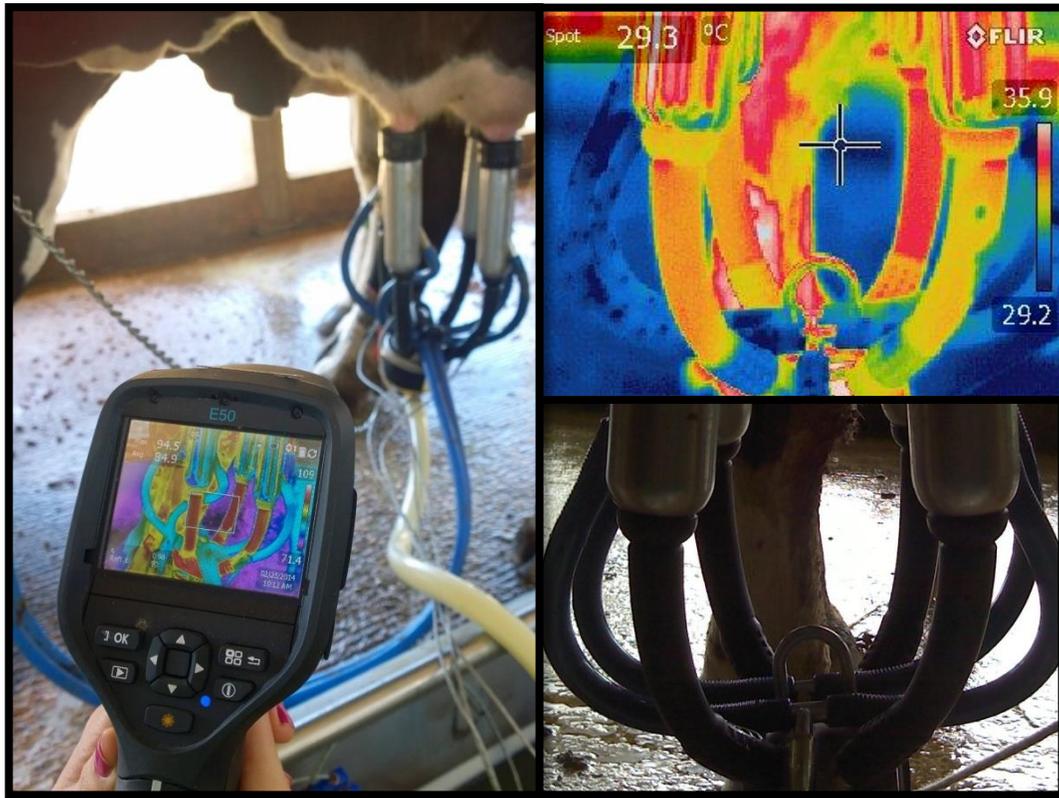
### Anejo 6. Colección de muestras asépticas de leche



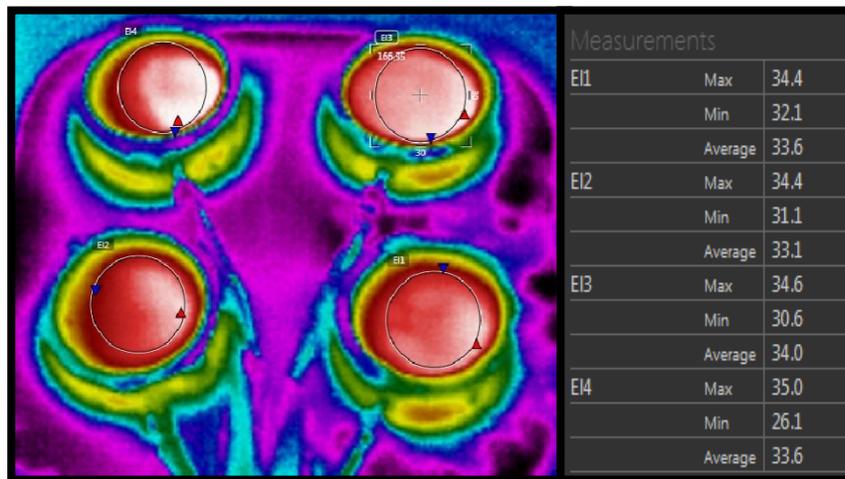
### Anejo 7. Sonda termal HYP3-16-1-1/2-T-U-48-RP colocada en el tubo corto



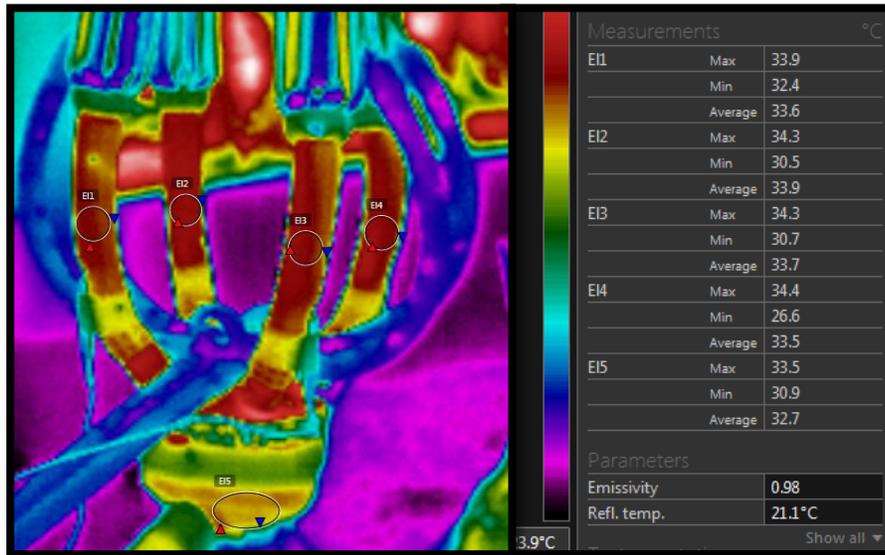
**Anejo 8. Toma de imagen termográfica infrarroja simultánea de los componentes de la máquina de ordeño**



**Anejo 9. Análisis de las imágenes termográficas infrarrojas de las muestras de leche**



**Anejo 10. Análisis de la imagen termográfica infrarroja de los componentes de máquina de ordeño**



**Anejo 11. Cambios en la termografía infrarroja de los tubos cortos, temperatura ambiental y temperatura rectal según la hora en la que se tomaron los datos**

| Hora            | TIRT <sup>a</sup>    | Temperatura ambiental | Temperatura rectal   |
|-----------------|----------------------|-----------------------|----------------------|
| 6               | 29.85 <sup>c</sup>   | 20.66 <sup>e</sup>    | 38.01 <sup>c,b</sup> |
| 7               | 30.70 <sup>c</sup>   | 20.51 <sup>e</sup>    | 38.17 <sup>b</sup>   |
| 8               | 32.49 <sup>b</sup>   | 23.74 <sup>d</sup>    | 37.84 <sup>c</sup>   |
| 9               | 33.66 <sup>a,b</sup> | 26.44 <sup>c</sup>    | 38.53 <sup>a</sup>   |
| 10              | 33.90 <sup>a,b</sup> | 27.73 <sup>b</sup>    | 38.53 <sup>a</sup>   |
| 11              | 34.48 <sup>a</sup>   | 28.71 <sup>a</sup>    | 38.55 <sup>a</sup>   |
| 12              | 34.32 <sup>a</sup>   | 29.42 <sup>a</sup>    | 38.74 <sup>a</sup>   |
| <b>Valor -P</b> | <0.0001              | <0.0001               | <0.0001              |

Valores con diferentes letras son significativamente diferentes p<0.05

<sup>a</sup> Termografía infrarroja promedio de los tubos cortos