



UNIVERSITAT
POLITÈCNICA
DE VALÈNCIA



Escola Tècnica Superior
d'Enginyeria Agronòmica
i del Medi Natural

UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

Escola Tècnica Superior d'Enginyeria Agronòmica i del Medi Natural

ANÁLISIS DE LECHE MEDIANTE ESPECTROSCOPÍA DE INFRARROJOS PARA LA DETERMINACIÓN DE MAMITIS SUBCLÍNICA EN EL GANADO CAPRINO

TRABAJO DE FINAL DE GRADO EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE LOS ALIMENTOS

Curso Académico: 2020-2021

VALENCIA, JULIO 2021

Alumno: Yoel Orts Tejero

Tutor académico: Cristòfol Peris Ribera

Cotutora: M^º Carmen Beltrán Martínez

ANÁLISIS DE LECHE MEDIANTE ESPECTROSCOPIA DE INFRARROJOS PARA LA DETERMINACIÓN DE MAMITIS SUBCLÍNICA EN EL GANADO CAPRINO

RESUMEN

El objetivo de este trabajo fue el de hallar una metodología que permitiera determinar la presencia de mamitis subclínica en el ganado caprino a partir de los análisis realizados con la Espectroscopía de Infrarrojo Medio con Transformada de Fourier (FT-MIR) en las muestras del Control Lechero Oficial. Para ello, se tomaron 540 muestras de leche de 180 cabras de raza Murciano-Granadina (360 muestras de glándula mamaria y 180 de leche ordeñada) procedentes de 7 granjas de la Comunidad Valenciana. Los animales fueron seleccionados para asegurar una elevada variabilidad en el RCS, número y mes de lactación.

En las muestras de leche ordeñada se analizaron los marcadores inflamatorios lactoferrina, "Milk Amiloyd A" (MAA) y el Recuento de Células Somáticas (RCS) como estimadores de la presencia de mamitis. En las muestras de glándula mamaria se llevó a cabo un análisis bacteriológico, para determinar la presencia o ausencia de infección intramamaria. Los tres marcadores inflamatorios fueron analizados estadísticamente con objeto de identificar sus factores de variación. La lactoferrina varió significativamente con el factor granja, pero no por la presencia de infección intramamaria ni por el mes de lactación. El MAA también presentó diferencias significativas entre granjas. Además, tanto el MAA como el RCS aumentaron en los animales afectados de mamitis subclínica y en aquellos que se encontraban en un estado de lactación más avanzado. El número de lactación de las cabras no afectó significativamente a ninguno de los tres marcadores estudiados.

Las calibraciones realizadas para estimar con FT-MIR el contenido de estos tres marcadores inflamatorios en las muestras del control lechero presentaron una baja precisión (coeficiente de determinación de 0,42 a 0,78; varianza explicada del 0,31 a 0,65). Por lo tanto, se concluye que, por el momento, no es posible identificar a los animales afectados de mamitis subclínica a partir de los análisis FT-MIR en las muestras del control lechero.

PALABRAS CLAVE: Cabra; Leche; Mamitis; Lactoferrina; Recuento de Células Somáticas.

RESUM

L'objectiu d'aquest treball va ser el de trobar una metodologia que permetera determinar la presència de mamitis subclínica en el bestiar caprí a partir dels anàlisis realitzats amb l'Espectroscòpia d'Infraroig Mitjà amb Transformada de Fourier (FT-MIR) en les mostres del Control Lleter Oficial. Per això, es van prendre 540 mostres de llet de 180 cabres de raça Murcià-Granadina (360 mostres de glàndula mamària i 180 de llet munyida) procedents de 7 granges de la Comunitat Valenciana. Els animals van ser seleccionats per a assegurar una elevada variabilitat en el RCS, número i mes de lactació.

En les mostres de llet munyida es van analitzar els marcadors inflamatoris lactoferrina, "Milk Amiloyd A" (MAA) i el Recompte de Cèl·lules Somàtiques (RCS) com a estimadors de la presència de mamitis. En les mostres de glàndula mamària es va dur a terme un anàlisi bacteriològic, per a determinar la presència o absència d'infecció intramamària. Els tres marcadors inflamatoris van ser analitzats estadísticament a fi d'identificar els seus factors de variació. La lactoferrina va variar significativament amb el factor granja, però no per la presència d'infecció intramamària ni pel mes de lactació. El MAA també va presentar diferències significatives entre granges. A més, tant el MAA com el RCS van augmentar en els animals afectats de mamitis subclínica i en aquells que es trobaven en un estat de lactació més avançat. El número de lactació de les cabres no va afectar significativament a cap dels tres marcadors estudiats.

Els calibratges realitzats per a estimar amb FT-MIR el contingut d'aquests tres marcadors inflamatoris en les mostres del control lleter van presentar una baixa precisió (coeficient de determinació de 0,42 a 0,78; variància explicada del 0,31 a 0,65). Per tant, es conclou que, de moment, no és possible identificar als animals afectats de mamitis subclínica a partir dels anàlisis FT-MIR en les mostres del control lleter.

PARAULES CLAU: Caprí; Llet; Mamitis; Lactoferrina; Recompte de Cèl·lules Somàtiques

ABSTRACT:

The aim of this work was to find a methodology that would allow determining the presence of subclinical mastitis in goats from the analyzes carried out with Fourier Transform Mid-Infrared Spectroscopy (FT-MIR) in the Official Milk Control samples. 540 milk samples were taken from 180 goats of the Murciano-Granadina breed (360 samples from the mammary gland and 180 from milked milk) from 7 farms in the Valencian Community. The animals were selected to ensure high variability in SCR, number and month of lactation.

In the milked samples, the inflammatory markers lactoferrin, "Milk Amiloyd A" (MAA) and the Somatic Cell Count (SCC) were analyzed as estimators of the presence of mastitis. Bacteriological analysis was carried out on the mammary gland samples to determine the presence or absence of intramammary infection. The three inflammatory markers were statistically analyzed in order to identify their variation factors. Lactoferrin varied significantly with the farm factor, but not due to the presence of intramammary infection or the month of lactation. The MAA also showed significant differences between farms. Furthermore, both MAA and RCS increased in animals affected by subclinical mastitis and in those that were in a more advanced lactation stage. The lactation number of the goats did not significantly affect any of the three markers studied.

The calibrations performed to estimate with FT-MIR the content of these three inflammatory markers in the milk control samples showed low precision (coefficient of determination from 0.42 to 0.78; explained variance from 0.31 to 0.65). Therefore, it is concluded that, at the moment, it is not possible to identify the animals affected by subclinical mastitis from the FT-MIR analyzes in the samples of the dairy control.

KEY WORDS: Goat; Milk; Mastitis; Lactoferrin; Somatic Cell Count

Alumno: Yoel Orts Tejero

Valencia, Julio de 2021

Tutor académico: Cristòfol Peris Ribera

Cotutora: M^o Carmen Beltrán Martínez

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, agradecer a mis tutores Cristòfol Peris Ribera y M^o Carmen Beltrán Martínez por su envidiable trabajo como educadores, darme la oportunidad de participar en un proyecto como este y orientarme a lo largo de su realización.

Segundo, gracias a Carlos, Martín y José Luís por su participación en la recogida de muestras y por su compañía. Por descontado, un sincero agradecimiento a todas las granjas que han participado en el trabajo por ofrecernos su tiempo y colaboración.

En tercer lugar, agradecer al personal de LICOVAL su paciencia, dedicación y esfuerzo trabajando de manera profesional pero amigable en el análisis de las muestras.

Por último, un especial agradecimiento a mi familia, por todo el apoyo que me han dado, es lo que me ha impulsado a llegar hasta aquí. Gracias a mis padres, Ana y Vicente y a mi pareja, Nieves.

¡Muchas gracias a todos!

ÍNDICE DEL DOCUMENTO

I. INTRODUCCIÓN	1
I.1. LA PRODUCCIÓN DE LECHE DE CABRA	1
I.2. MAMITIS	3
I.3. ESPECTROSCOPÍA INFRARROJA	6
II. OBJETIVO	9
III. MATERIALES Y MÉTODOS	10
III.1. DISEÑO EXPERIMENTAL	10
III.2. TOMA Y PROCESADO DE LAS MUESTRAS	11
III.3. ANÁLISIS DE LAS MUESTRAS DE LECHE	12
III.3.1. ANÁLISIS BACTERIOLÓGICO	12
III.3.2. COMPOSICIÓN QUÍMICA, RCS y PH	14
III.3.3. ANÁLISIS DE LACTOFERRINA Y MAA	14
III.3.4. ANÁLISIS ESTADÍSTICO Y PROCESO DE CALIBRACIÓN	15
IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	17
V. CONCLUSIONES	26
VI. BIBLIOGRAFÍA	27

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Evolución de la producción de leche de cabra a nivel mundial en los últimos 60 años (FAOSTAT, 2020).....	1
Figura 2. Producción de leche de cabra (%) por continentes (FAOSTAT, 2020)	2
Figura 3. Efecto de la mamitis subclínica en el rendimiento quesero (Yc) y en el tiempo de coagulación (Tc) en leche procedente de glándulas infectadas y no infectadas. Barra sólida = Glándulas sanas; Barra a rayas = Glándulas infectadas (Leitner et al., 2004).....	4
Figura 4. Medida de la firmeza del queso utilizando un analizador de textura en bloques de queso. Línea gruesa = Glándulas sanas; Línea fina = Glándulas infectadas (Merin et al., 2008) ..	4
Figura 5. Esquema sobre el funcionamiento de la espectroscopía de infrarrojos (Scientific, 2013)	7
Figura 6. Absorbancia vs longitud de onda (cm-1; Nicolaou et al., 2010)	7
Figura 7. Diseño experimental del estudio	10
Figura 8. Ejemplo de sala de ordeño de cabras de la raza Murciano-Granadina	12
Figura 9. Pruebas bioquímicas realizadas para identificar los casos de mamitis subclínica	13
Figura 10. Esquema para la identificación de mamitis causada por bacterias	13
Figura 11. MilkoScan FT6000 (FOSS) combinado con Fossomatic FT5000 (FOSS) en el laboratorio LICOVAL (UPV).....	14
Figura 12. Reactivos y fotómetro utilizado para el análisis de MAA en muestras de leche	15
Figura 13. Evolución de los valores medios de lactoferrina, MAA y RCS a lo largo de la lactación en leche de cabra de la raza Murciano-Granadina	19
Figura 14. Valores medios de Lactoferrina, MAA y RCS en leche de cabra procedente de cabras sanas (n=125) y cabras afectadas de infección intramamaria según el tipo de microorganismo aislado: Corynebacterium spp. (n=22) y Estafilococos coagulasa negativo-ECN (n= 29).....	21
Figura 15. Relación entre lactoferrina y MAA en la leche de cabra.....	22
Figura 16. Relación entre lactoferrina y logRCS en la leche de cabra	23
Figura 17. Relación entre el MAA y logRCS en la leche de cabra	23

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Características de las muestras individuales de leche de cabra Murciano-Granadina utilizadas en el estudio.....	17
Tabla 2. Efecto de la granja sobre la concentración de marcadores inflamatorios en la leche de cabra Murciano-Granadina	18
Tabla 3. Efecto número de parto sobre la concentración de marcadores inflamatorios en la leche de cabra Murciano-Granadina.	18
Tabla 4. Efecto mes de lactación sobre la concentración de marcadores inflamatorios en la leche de cabra Murciano-Granadina.	19
Tabla 5. Efecto de la presencia de mastitis sobre la concentración de marcadores inflamatorios en la leche de cabra Murciano-Granadina	20
Tabla 6. Coeficientes de correlación (r) entre los marcadores inflamatorios estudiados y las variables de pH y de la producción y composición en leche de cabra.....	22
Tabla 7. Características y estadísticos obtenidos en los procesos de regresión realizados para obtener las mejores calibraciones para estimar la concentración de los marcadores inflamatorios lactoferrina ($\mu\text{g}/\text{mL}$), MAA ($\mu\text{g}/\text{mL}$) y RCS ($\times 1000$ células/ mL)	25

LISTA DE ABREVIATURAS

FT-MIR: Metodología de Infrarrojo Medio con Transformada de Fourier

NIR: Infrarrojo Cercano

LF: Lactoferrina

RCS: Recuento de Células Somáticas

MAA: "Milk Amiloyd A"

AMURVAL: Asociación de Ganaderos de Caprino de Raza Murciano-Granadina de la Comunidad Valenciana

LICOVAL: Laboratorio Interprofesional Lechero de la Comunidad Valenciana

Yc: Rendimiento Quesero

Tc: Tiempo de Coagulación

RDIF: Identificador por Radiofrecuencia

GLM: Modelo Lineal Generalizado

ECN: Estafilococos Coagulasa Negativa

R²: coeficiente de determinación

r: coeficiente de correlación

n: número de muestras

m: media

ES: Error Estándar

DS: Desviación Estándar

PLC: Cuadrados Mínimos Parciales

SEC: Error Estándar de Calibración

SECV: Error Estándar de Validación Cruzada

1-VR: Varianza explicada

I. INTRODUCCIÓN

I.1. LA PRODUCCIÓN DE LECHE DE CABRA

El ganado caprino fue una de las primeras especies domesticadas por el hombre para la obtención de alimento hace unos 10.000 años. Desde entonces, la cabra ha acompañado a la humanidad apareciendo en relatos de diversa índole, como pueden ser históricos, bíblicos y mitológicos (Bidot, 2017).

La importancia de la cabra deriva de la diversidad de productos que puede ofrecer, como por ejemplo leche, carne y pieles. Nutricionalmente, la leche de cabra se caracteriza por su similitud con la leche humana, siendo sana y nutritiva y, en muchos casos, se considera una alternativa válida como sustituta de la leche materna (Bidot, 2017). A pesar de ello, en comparación con la leche humana y la de vaca, tiene una mayor concentración en calcio, sodio y fósforo; además, es tolerada por aproximadamente una cuarta parte de los consumidores con desórdenes gastrointestinales o alergias derivadas del consumo de la leche de vaca. En algunos países subdesarrollados se recomienda la leche de cabra para combatir ciertas enfermedades como la tuberculosis o la disentería (Bhattarai, 2012).

A pesar de que en muchos países el consumo de leche de cabra es prácticamente inexistente, el nivel productivo a escala global no ha dejado de aumentar desde que tenemos registro, creciendo significativamente a partir de los años noventa, tal y como se muestra en la Figura 1.

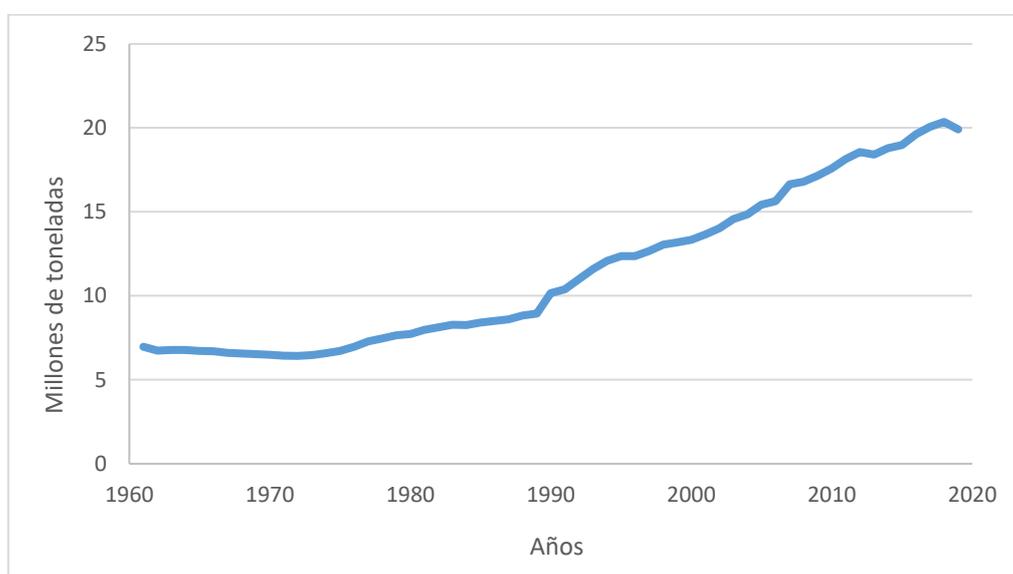


Figura 1. Evolución de la producción de leche de cabra a nivel mundial en los últimos 60 años (FAOSTAT, 2020)

En el mundo se producen actualmente alrededor de 20 millones de toneladas de leche de cabra, el 80% de la cual se obtiene en Asia (58,7%) y África (21,9%; Figura 2). Los principales países productores son la India y Bangladesh con 5,4 y 2,75 millones de toneladas, respectivamente (FAOSTAT, 2020).

A nivel europeo se consolidan como mayores productores Francia (28,6% de la producción de la Unión Europea), España (27,5%) y los Países Bajos (22%). En España, la Comunidad Autónoma más destacable es Andalucía que sustenta un 42,1% de su producción; en la Comunidad Valenciana encontramos unas 130 explotaciones de caprino lechero, mayoritariamente de la raza Murciano-Granadina, que producen el 2% del total de leche de cabra producida en España (MAGRAMA, 2019).

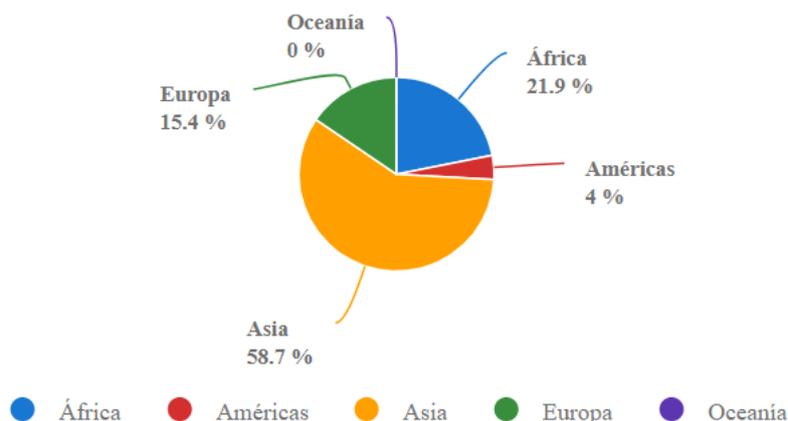


Figura 2. Producción de leche de cabra (%) por continentes (FAOSTAT, 2020)

La gran capacidad de adaptación de este pequeño rumiante ha permitido extender su producción a prácticamente cualquier parte del mundo, diferenciándose dos grandes sistemas de producción. En primer lugar, en los países en desarrollo asiáticos, africanos y americanos, o los que se encuentran en situación de extrema pobreza, se prioriza la adaptabilidad en entornos muy rurales, utilizando animales con menor nivel productivo, pero bien adaptados a las condiciones ambientales que pueda presentar cada zona. Gracias al desarrollo de esta capacidad, la leche de cabra representa un sustento económico rentable para invertir, ya que requiere de bajo capital debido al poco terreno, mano de obra y mantenimiento necesarios, contribuyendo a la sostenibilidad de la población en zonas desfavorecidas (Bhattarai, 2012).

Por otra parte, en los países más industrializados se utilizan sistemas de explotación intensivos, en los que se prioriza la mejora del nivel productivo de los animales y de la calidad de la leche. Habitualmente, en estos países la leche de cabra no se consume de manera directa, sino que se utiliza para la elaboración de productos derivados como el queso y el yogur. Por ejemplo, en España más del 90% de la producción de leche de cabra se destina a la elaboración de queso (MAGRAMA, 2019).

En este contexto, la calidad de la leche ordeñada adquiere especial importancia ya que determina los rendimientos productivos y la calidad de los productos derivados. De esta forma surge el concepto de control lechero, una herramienta crucial en el desarrollo de los programas de mejora genética del ganado lechero. En esta actividad se determina periódicamente (cada 30 ó 42 días) la cantidad de leche producida por cada animal y se analizan sus componentes principales (grasa, proteína y extracto seco), además del recuento de células somáticas (RCS)

que funciona como estimador del estado sanitario de la ubre. Esta información se utiliza para realizar la evaluación genética de la población y mejorar el rebaño constantemente (Martínez y Peris, 2002). En España, la gestión del Control Lechero Oficial es autonómica y los análisis de las muestras individuales de leche se realizan en laboratorios interprofesionales lecheros que disponen de equipos automáticos basados en la espectroscopía de infrarrojo, para determinar la composición química, y en la citometría de flujo, para el análisis del RCS.

La principal raza caprina lechera española, en censo y producción, es la raza Murciano-Granadina, la cual se explota en muchas comunidades autónomas (Andalucía, Murcia y otras, como la Comunidad Valencia) por sus particularidades productivas y su adaptación a nuestras condiciones ambientales, además de que en los últimos años ha despertado interés internacional, con exportaciones de semen y animales. Actualmente existe un programa de mejora genética en esta raza caprina que se basa en los datos genealógicos y en los del Control Lechero Oficial. En el caso de la Comunidad Valenciana, la gestión del control lechero oficial de la raza Murciano-Granadina recae en la Asociación de Ganaderos de Caprino de Raza Murciano-Granadina de la Comunidad Valenciana (AMURVAL) y los análisis de la leche se realizan en el Laboratorio Interprofesional Lechero de la Comunidad Valenciana (LICOVAL) ubicado en la Universitat Politècnica de València (UPV).

I.2. MAMITIS

La mamitis es una enfermedad que provoca una inflamación de la glándula mamaria. Aunque ocasionalmente puede ser provocada por traumatismos, mayoritariamente aparece cuando los microorganismos acceden al interior de la ubre a través del canal del pezón. Es imposible de erradicar de las explotaciones ganaderas, puesto que existen una gran variedad de gérmenes que pueden provocar este trastorno y, además, muchos de ellos pueden sobrevivir en el hábitat extramamario. Así mismo, existen factores que aumentan el riesgo de que surjan casos de mamitis en los animales del rebaño, como por ejemplo alojamientos inadecuados, camas sucias, excesivas corrientes de aire, elevada producción de leche, no respetar los periodos de secado previos al nuevo parto, máquina y/o rutina de ordeño inadecuadas...

La mamitis altera la anatomía y fisiología de la ubre, además de que empeora la calidad de la leche y de que se transfieren células inflamatorias (leucocitos) de la sangre a la leche. En la leche también aparecen, además de los leucocitos, células epiteliales procedentes del tejido mamario. Al conjunto de leucocitos y células epiteliales de la leche se le denomina células somáticas (García et al., 2012).

Se denomina mamitis clínica cuando la enfermedad presenta síntomas que se pueden detectar fácilmente, en la leche (cambios en el color, presencia de grumos...) y/o en la propia ubre (ubre inflamada, presencia de nódulos...). En estos casos existe una pérdida económica evidente para el ganadero, debido a que el animal va a producir menos leche y, además, esta leche no debe ser comercializada.

Por otra parte, se denomina mamitis subclínica cuando la enfermedad no produce síntomas detectables a simple vista. Los animales que sufren este tipo de mamitis suelen disminuir su producción (habitualmente entre un 10 y un 20%) y, en la leche, se altera la composición y su calidad, además de que se incrementa el recuento de células somáticas. Tiene un elevado

impacto económico para el ganadero, debido a su elevada incidencia y difícil detección (Andresen, 2001). También se ha comprobado que la mamitis subclínica afecta negativamente a la aptitud tecnológica de la leche para su transformación en queso (Leitner et al., 2004; Merin et al., 2008; Figura 3) y a las características organolépticas de los productos derivados (Figura 4).

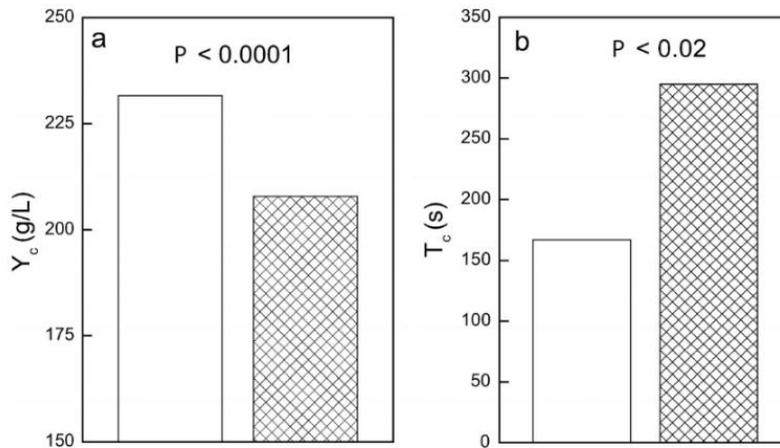


Figura 3. Efecto de la mamitis subclínica en el rendimiento quesero (Y_c) y en el tiempo de coagulación (T_c) en leche procedente de glándulas infectadas y no infectadas. Barra sólida = Glándulas sanas; Barra a rayas = Glándulas infectadas (Leitner et al., 2004)

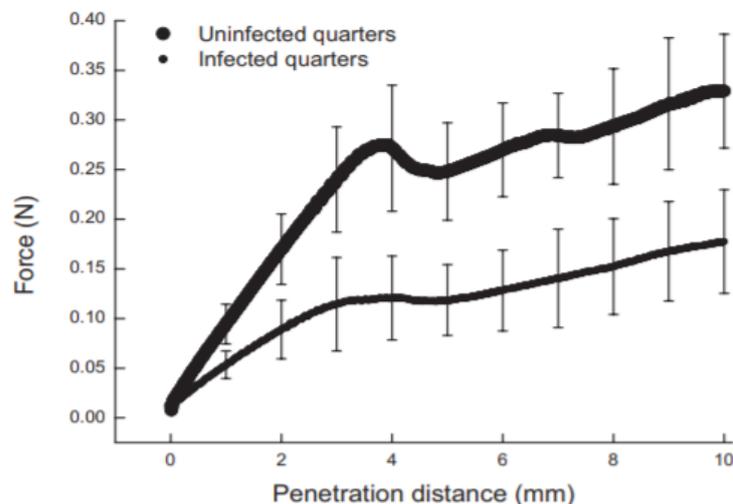


Figura 4. Medida de la firmeza del queso utilizando un analizador de textura en bloques de queso. Línea gruesa = Glándulas sanas; Línea fina = Glándulas infectadas (Merin et al., 2008)

La mamitis, por tanto, puede tener un gran impacto económico para el ganadero ya que los actuales sistemas de pago por calidad de la leche de cabra, basados en el contenido de extracto quesero, también pueden incluir primas y penalizaciones para el productor en función de la calidad higiénica de la leche, es decir, que su recuento de células somáticas se encuentre dentro de un rango considerado adecuado. Estas medidas incitan al ganadero a investigar si existe un problema en la explotación y solucionarlo rápidamente (Contreras et al., 2001).

Para determinar la presencia y cuantificar el grado de mamitis subclínica a partir de la leche, podemos utilizar una metodología directa o indirecta.

En la metodología directa se realiza un análisis bacteriológico de las muestras de leche, tomadas directamente de la glándula mamaria en condiciones asépticas, utilizando medios de cultivo adecuados que permitan detectar la presencia o ausencia de patógenos mamarios. Además, también se puede identificar la especie o grupo microbiano del patógeno infeccioso involucrado. Por otra parte, para la metodología indirecta se relaciona un factor, característica o la concentración de un analito en la leche con la enfermedad.

El método de diagnóstico indirecto utilizado tradicionalmente es el RCS. Se trata de un método preciso y de mucha utilidad en el ganado vacuno y ovino lechero. Sin embargo, en el ganado caprino tiene una mayor complejidad debido a la gran influencia que tienen sobre este parámetro algunos factores no infecciosos como, por ejemplo:

- Celo: ya sea de manera natural o inducida, se ha encontrado un incremento del RCS independiente de la producción de leche (McDougall y Voermans, 2002).
- Estado de lactación: algunos lo consideran el principal factor de variación del RCS no infeccioso. La evolución del RCS suele ser inverso a la curva de producción de leche, es decir, los recuentos aumentan después del parto y hacia el final de la lactación (Sharma et al., 2011).
- Número de lactación: en el ganado vacuno el RCS no aumenta prácticamente con la edad, sin embargo, en las cabras se observan incrementos significativos conforme aumenta el número de lactación (Paape et al., 2007).

Por esta razón, sería importante poder encontrar un analito que permitiera relacionar de manera precisa y repetible su concentración en la leche con la presencia de mamitis subclínica en el ganado. Con este objetivo se han estudiado algunos marcadores inflamatorios específicos como, por ejemplo, la lactoferrina y el "Milk Amyloid A"(MAA).

La lactoferrina es una proteína globular de la familia transferrinas con afinidad por los iones de hierro. Se considera una de las proteínas de defensa más importantes contra enfermedades no específicas para los mamíferos, encontrándose de manera abundante en diversos fluidos biológicos como la leche (García-Montoya et al., 2012).

Algunos autores correlacionan la concentración de lactoferrina con la calidad de la leche, encontrándose valores más elevados en leches de baja calidad, lo que podría significar una relación entre la concentración de lactoferrina y la infección por mamitis subclínica (Hiss et al., 2008). Por otra parte, en vacuno se ha demostrado que la concentración de esta proteína aumenta tanto en mamitis inducidas como naturales, de modo que es posible que ello también ocurra en ganado caprino (Hiss et al., 2008).

En segundo lugar, el MAA es una proteína de fase aguda cuya concentración aumenta en ausencia de cambios macroscópicos de la leche pudiendo llegar a preceder a los síntomas clínicos. Se trata de un biomarcador muy específico en la identificación de la mamitis subclínica y una de las primeras proteínas generadas en la leche en la etapa anterior a la manifestación de síntomas clínicos (Quintas et al., 2018).

En ganado caprino, Sequeira et al. (2014) encuentran que las glándulas afectadas de mamitis subclínica presentan, respecto a las glándulas sanas, valores más elevados de MAA. Sin embargo,

estos autores concluyen que se requieren más estudios para confirmar la precisión y utilidad de esta técnica como método de detección de mamitis.

Hallar una relación entre la concentración de alguno de estos marcadores y la presencia de mamitis subclínica en el ganado caprino supondría un gran avance en el sector primario debido a la importancia de crear una metodología de identificación precisa, efectiva, repetible y económica para las explotaciones ganaderas de leche de cabra.

I.3. ESPECTROSCOPÍA INFRARROJA

La espectroscopía infrarroja, también conocida como espectroscopía vibracional, se trata de la medida de la interacción de una onda electromagnética respecto a la materia con la que actúa, provocando un fenómeno de absorción, emisión o reflexión que nos permite identificar y cuantificar la presencia de ciertas sustancias químicas o grupos funcionales. Es una de las técnicas analíticas más importantes para conseguir información sobre aspectos cuantitativos y cualitativos de analitos en tiempo real (Derrick et al., 2000).

La porción infrarroja del espectro electromagnético se puede dividir en tres regiones dependiendo de la energía producida. Clasificada de mayor a menor energía encontramos:

- Infrarrojo cercano (NIR): entre 0,7 y 2,5 μm de longitud de onda, es capaz de excitar los modos de vibraciones moleculares armónicos o combinados. Se trata de un método de mucha utilidad para las determinaciones cuantitativas y la monitorización "*in situ*". Se puede utilizar para el análisis de alimentos, como por ejemplo la leche de vaca.
- Infrarrojo medio (MIR): entre 2,5 y 20 μm de longitud de onda, lo utilizamos para estudiar las vibraciones fundamentales y su estructura rotacional-vibratoria asociada. Es utilizado ampliamente en el análisis de leche debido a que en el espectro obtenido diferenciamos bandas significativas en función de los grupos funcionales que contenga.
- Infrarrojo lejano: entre 20 y 500 μm de longitud de onda, se utiliza en espectroscopía rotacional y para determinar las vibraciones de baja frecuencia.

La metodología se basa en generar un haz de luz a partir de un interferómetro que penetre en la leche (debido a que se trata de un alimento líquido), gracias a sus espejos modulará un espectro en un interferograma que, utilizando el algoritmo denominado Transformada de Fourier, nos permitirá medir todas las frecuencias al mismo tiempo. De esta forma, obtenemos un espectro que podemos interpretar para determinar los distintos grupos funcionales que se encuentran en la leche (Derrick et al., 2000; De Fuentes et al., 2008).

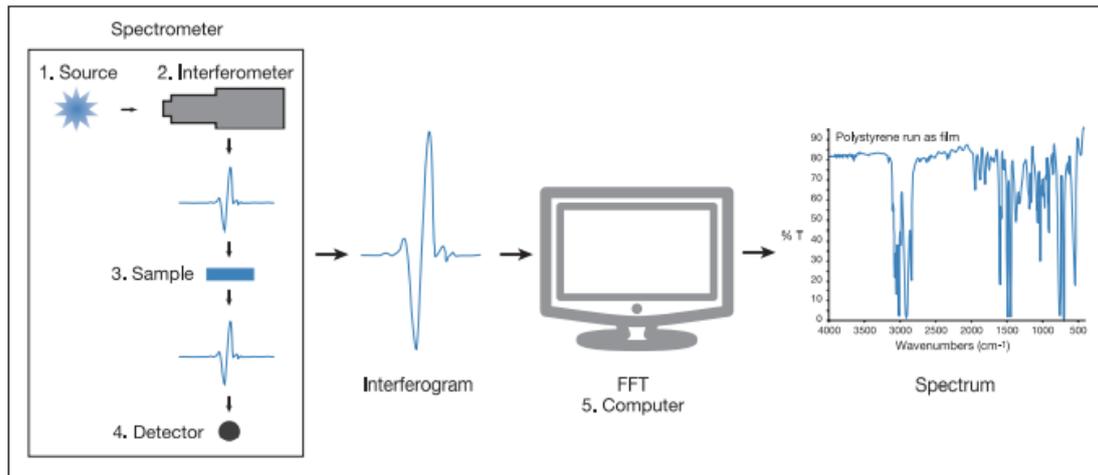


Figura 5. Esquema sobre el funcionamiento de la espectroscopía de infrarrojos (Scientific, 2013)

Un ejemplo de los espectros registrados por la metodología de infrarrojo medio con transformada de Fourier (FT-MIR) en muestras de leche se presenta en la Figura 6, donde en el eje Y situamos la absorbancia o cantidad de energía absorbida por un cuerpo al ser atravesada por el haz de luz y en el eje X, la longitud de onda correspondiente. Cada pico representaría un analito dentro del producto, esto es debido a que cuando el haz de luz choca con el grupo funcional en cuestión es incapaz de atravesar el producto obteniendo una transmitancia muy baja y, por lo tanto, permitiéndonos averiguar qué grupos funcionales contiene, lo que nos facilita relacionarlo con sus componentes.

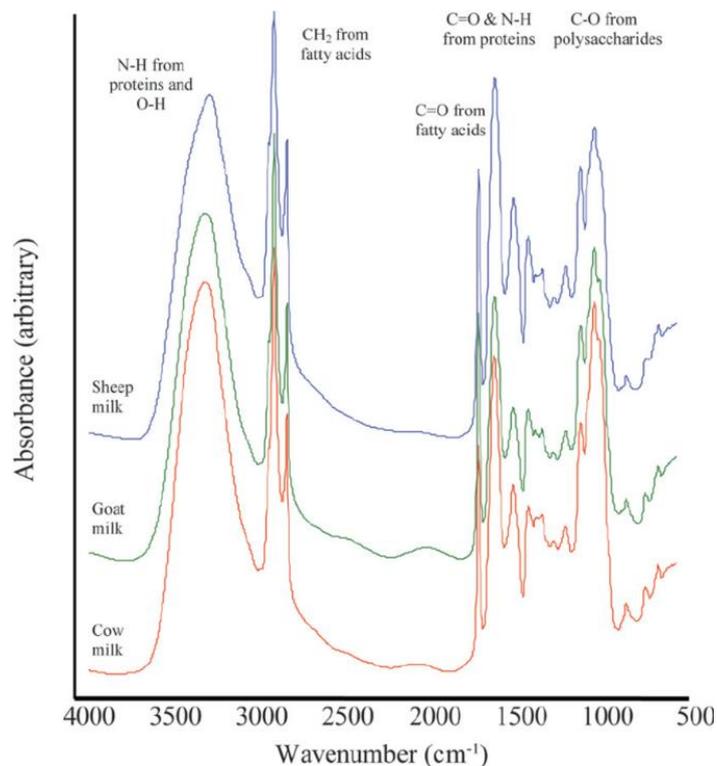


Figura 6. Absorbancia vs longitud de onda (cm⁻¹; Nicolaou et al., 2010)

A pesar de que habitualmente la espectroscopía FT-MIR se utiliza rutinariamente para medir los componentes principales de la leche (grasa, proteína, lactosa y materia seca), en los últimos años han aparecido estudios con calibraciones que nos permiten determinar nuevos componentes de interés y características relacionadas con la calidad de leche y sus derivados, como el rendimiento quesero, además de biomarcadores que permiten la detección de ciertos estados fisiológicos (gestación, metano y otros desequilibrios nutricionales) y el propio bienestar del animal.

La utilización de la tecnología FT-MIR para la detección de mamitis en ganado caprino lechero sería de gran interés y contribuiría a la sostenibilidad y mejora de la producción caprina. Sin embargo, hasta el momento, los intentos de predecir el RCS a partir del FT-MIR no han tenido éxito, ni en leche de vaca (Brandt et al., 2010) ni de cabra (Marissal y Marinot, 2016). En cuanto a los marcadores inflamatorios, se han publicado algunos trabajos con modelos de predicción aceptables en vacuno lechero (Soyeurt et al., 2012; Bastin et al., 2016) pero no existen trabajos que hayan estudiado con FT-MIR estos biomarcadores o la predicción de mamitis directamente de los espectros en ganado caprino lechero.

II. OBJETIVO

El objetivo general de este trabajo es evaluar la concentración de los marcadores inflamatorios lactoferrina y MAA en la leche de cabra como herramienta para monitorizar la salud de la ubre en ganado caprino, dadas las limitaciones del RCS como indicador de mamitis en esta especie. En concreto se plantean los siguientes objetivos específicos:

1. Estudiar la relación existente entre la concentración de lactoferrina, MAA y RCS en la leche procedente de cabras sanas y afectadas de mamitis subclínica, así como la variación de estos marcadores con el número y estado de lactación de los animales.
2. Realizar una primera evaluación de la espectroscopía de infrarrojos (MIR) para estimar el contenido de lactoferrina, MAA y RCS en las muestras de control lechero.

La consecución de estos objetivos permitiría disponer de un método económico, preciso y repetible para la detección de mamitis subclínica en cabras lecheras, lo que facilitaría al ganadero la monitorización del estado sanitario de su rebaño a partir de los datos del control lechero oficial.

III. MATERIALES Y MÉTODOS

III.1. DISEÑO EXPERIMENTAL

En la Figura 7 se presenta el esquema del diseño experimental utilizado para la evaluación de los diferentes marcadores inflamatorios en leche como predictores de mastitis subclínica en ganado caprino lechero.

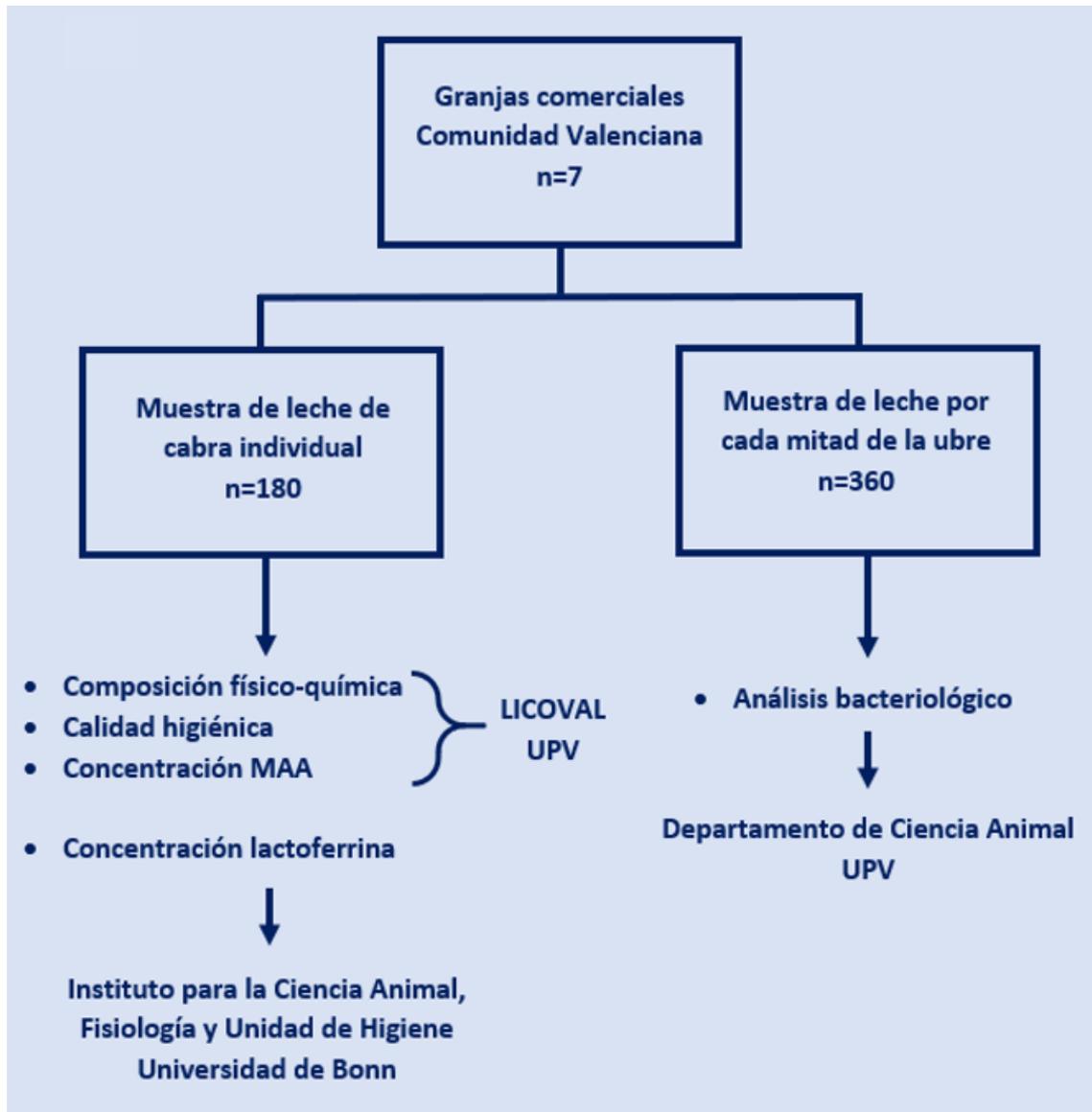


Figura 7. Diseño experimental del estudio

Las muestras de leche procedían de 7 granjas comerciales de caprino lechero inscritas en la asociación de ganaderos AMURVAL, las cuales realizaban, cada 42 días, el control lechero oficial. En cada una de las explotaciones se seleccionaron entre 30 y 36 cabras, de modo que existiera variabilidad en el número de lactación, mes de lactación y el RCS. Estos animales se eligieron antes de realizar la visita a la granja, utilizando los resultados del último control lechero oficial realizado.

De cada una de las cabras seleccionadas se tomaron dos tipos de muestras de leche. En primer lugar, una por cada mitad de la ubre del animal (glándula mamaria) con la finalidad de realizar

un examen bacteriológico para identificar la presencia de mamitis subclínica. A continuación, se registró la producción de leche ordeñada de cada animal y se tomó una segunda muestra de la leche ordeñada, en la cual se determinaron los siguientes parámetros:

1. La concentración de los marcadores lactoferrina y MAA, mediante métodos específicos de laboratorio.
2. El RCS y la composición química analizada habitualmente en los laboratorios interprofesionales lecheros en las muestras de control lechero (grasa, proteína bruta, lactosa, materia seca).
3. El pH.
4. El registro del espectro (absorbancias en cada longitud de onda) en un equipo automático de espectroscopía de infrarrojos MIR.

En las visitas realizadas para la toma de muestras los animales se localizaban durante el ordeño con un lector de Identificación por Radiofrecuencia (RFID), puesto que la mayor parte de las cabras estaban identificadas con un chip. Sin embargo, era frecuente que no se pudieran localizar a todas las cabras previamente seleccionadas. Por ello, el número total de animales muestreados fue de 180 y, por tanto, se dispuso de 360 muestras de leche de glándula mamaria y de 180 muestras de leche ordeñada.

III.2. TOMA Y PROCESADO DE LAS MUESTRAS

Para cada animal seleccionado, se tomó en primer lugar una muestra de leche de cada glándula mamaria. Para ello, tras desechar los primeros chorros de leche, se limpió el extremo del pezón con algodón impregnado en alcohol al 70% para asegurarse de que la muestra no estuviera contaminada por las bacterias del epitelio superficial de la cabra ni del canal del pezón. A continuación, se tomaron unos 5 mL de leche en un tubo estéril.

En segundo lugar, de cada cabra se tomaron unos 500 mL de leche directamente de los medidores volumétricos acoplados a la sala de ordeño (Figura 8). Una vez finalizado el ordeño se anotó el volumen total de leche producida por cada cabra y se homogeneizó el contenido para asegurarse de que la muestra fuera lo más representativa posible.

Todas las muestras se mantuvieron en refrigeración hasta su llegada al laboratorio y se almacenaron a 4°C hasta el día siguiente, momento en que fueron procesadas. Las muestras de glándula mamaria fueron sembradas entre las 24 y 30 horas tras su recogida. De cada una de las muestras de la leche ordeñada se tomaron alícuotas para obtener las siguientes submuestras:

1. Unos 40 mL de leche, en un frasco de 50 mL, para inmediatamente llevar a cabo el análisis de la composición química, el RCS y el registro del espectro.
2. 1,7 mL de leche en un tubo Eppendorf para el análisis de lactoferrina.
3. 1,7 mL de leche en un tubo Eppendorf para el análisis de MAA.
4. Unos 40 mL de leche, en un frascos de 50 mL, para ser guardada en congelación (-20°C) en previsión de poder realizar nuevos análisis en el futuro.

Con la leche restante se analizó inmediatamente el pH. Las muestras en tubos Eppendorf se mantuvieron en congelación (-20°C), un máximo de 3 meses, hasta el momento de realizar los análisis de lactoferrina y MAA.



Figura 8. Ejemplo de sala de ordeño de cabras de la raza Murciano-Granadina

III.3. ANÁLISIS DE LAS MUESTRAS DE LECHE

Los análisis bacteriológicos, del marcador MAA y del pH de la leche se realizaron en el Departamento de Ciencia Animal de la UPV. Las determinaciones de la composición química de la leche (grasa, proteína, lactosa y extracto seco) y el RCS se realizaron en el Laboratorio Interprofesional Lechero de la Comunidad Valenciana (LICOVAL, UPV). Por último, el análisis de lactoferrina se llevó a cabo en el Instituto para la Ciencia Animal, Fisiología y Unidad de Higiene de la Universidad de Bonn (Katzenburgweg, Bonn, Alemania).

III.3.1. ANÁLISIS BACTERIOLÓGICO

El examen bacteriológico de las muestras de leche, tomadas directamente de la glándula mamaria de los animales, se realizó siguiendo las recomendaciones del National Mastitis Council (2017) para determinar la presencia de mamitis subclínica y el agente infeccioso involucrado en el proceso.

El procedimiento analítico seguido en el laboratorio para realizar la identificación de los animales con mamitis subclínica y el agente etiológico implicado se presenta esquemáticamente en la Figura 10.

En primer lugar, se sembraron 10 μ L de cada muestra de leche en un cuarto de placa Petri que contenía agar Columbia con un 5% de sangre de cordero (Columbia Blood Agar, Scharlau, Barcelona). Seguidamente se dejaron incubar las placas invertidas a 37°C durante siete días, controlando el crecimiento (número de colonias crecidas y morfología del cultivo) al cabo de 1, 2 y 7 días.

Se consideraron positivos los cultivos puros con al menos 3 colonias (300 UFC/mL). A partir de estas colonias se realizaron una serie de pruebas (Figura 9) con objeto de identificar la especie o grupo bacteriano: tinción de Gram, prueba de la catalasa con peróxido de hidrógeno 3%, prueba de la coagulasa (Coagulase test, Liofilchem Diagnostici, Roseto degli Abruzzi) y test de aglutinación en látex para la identificación de *S. aureus* (Microgen Staph, Microgen Bioproducts Ltd. Camberley).

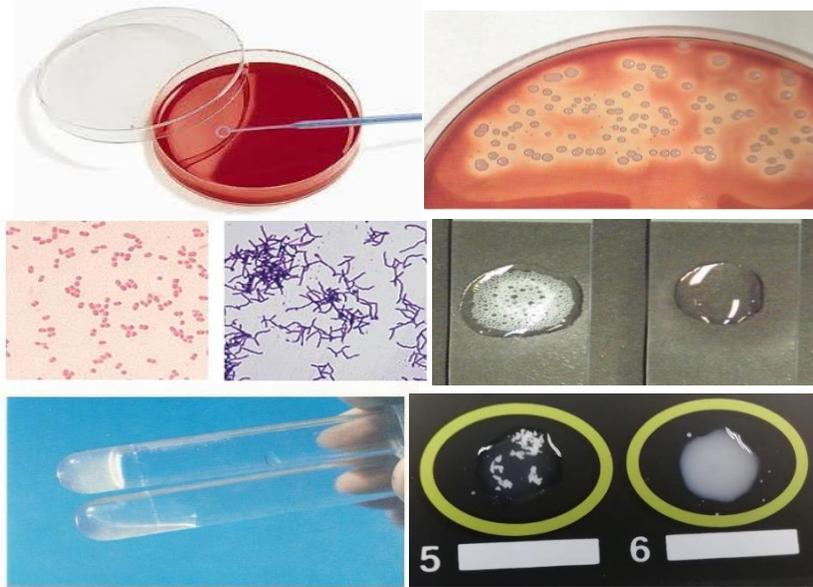


Figura 9. Pruebas bioquímicas realizadas para identificar los casos de mastitis subclínica

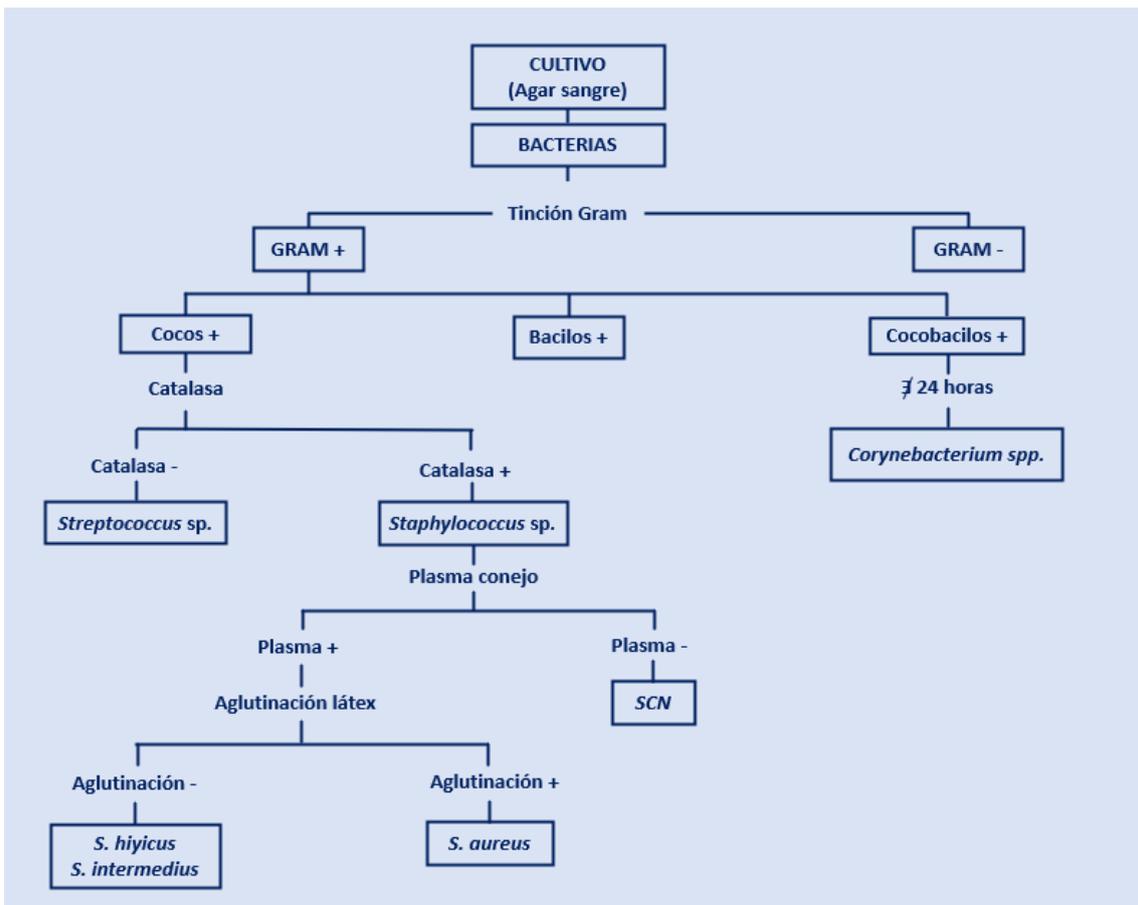


Figura 10. Esquema para la identificación de mastitis causada por bacterias

III.3.2. COMPOSICIÓN QUÍMICA, RCS y PH

El análisis de los principales componentes de la leche (grasa, proteína bruta, lactosa y materia seca) y el registro de los espectros se llevaron a cabo con el equipo automático Milkoscan FT 6000 (Foss, Hillerød, Dinamarca), basado en la espectroscopía de infrarrojo medio con transformada de Fourier (Figura 11).

El RCS se determinó por citometría de flujo utilizando el equipo Fossomatic TF 5000 (Foss). Este equipo (Figura 11) consta de un microscopio a través del cual se realiza de forma electrónica el recuento de las células que han sido previamente marcadas con un colorante fluorescente (bromuro de etidio), a partir de las fluorescencias emitidas por cada una de ellas al atravesar un capilar iluminado por una radiación UV

El pH de las muestras de leche se analizó con un pH-metro convencional (Basic 20, Crison, Barcelona).



Figura 11. MilkoScan FT6000 (FOSS) combinado con Fossomatic TF5000 (FOSS) en el laboratorio LICOVAL (UPV)

III.3.3. ANÁLISIS DE LACTOFERRINA Y MAA

La determinación de lactoferrina se realizó en el Instituto para la Ciencia Animal, Fisiología y Unidad de Higiene de la Universidad de Bonn (Alemania) utilizando un método ELISA competitivo desarrollado en ese mismo laboratorio y que ha sido descrito por Hiss et al. (2008).

La concentración de MAA en las muestras individuales de leche de cabra se llevó a cabo utilizando un método ELISA de tipo sándwich comercial (Milk Amyloid A Mast ID ELISA, Tridelta Development Ltd, Wicklow, Leinster, Ireland). En los primeros análisis se comprobó que la leche de cabra presentaba una concentración de MAA que superaba mucho el rango de la recta de calibración, por lo que se decidió llevar a cabo una dilución previa de las muestras en agua (1/10) y, a continuación, aplicar el procedimiento analítico indicado por los fabricantes. Una vez finalizado el proceso de reacción antígeno-anticuerpo se llevó a cabo la lectura de las placas, por duplicado, con un fotómetro Multiskan EX (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA) a 450 nm longitud de onda y 630 nm de longitud de onda como referencia. El cálculo de la concentración de MAA a partir de la recta de calibración se llevó a cabo utilizando el programa Excel 2016.



Figura 12. Reactivos y fotómetro utilizado para el análisis de MAA en muestras de leche

III.3.4. ANÁLISIS ESTADÍSTICO Y PROCESO DE CALIBRACIÓN

Cada uno de los tres marcadores inflamatorios considerados (lactoferrina, MAA y logRCS) fueron analizados estadísticamente con el PROC GLM (General Lineal Model) del programa informático SAS (SAS, v9.2 2011) utilizando el siguiente modelo:

$$y = \mu + GAN + NPAR + EL + IMI + \text{Interacciones} + \text{error}$$

Donde:

- Y: cada una de las variables estudiadas (lactoferrina, MAA y logRCS)
- μ : valor medio
- GAN : efecto de la granja (1-7)
- NPAR: efecto del número de parto de la cabra (1, 2+3, 4+5, ≥ 6)
- EL: efecto del estado de lactación (1+2, 3+4+5, 6+7+8, ≥ 9 meses)
- IMI: efecto de la infección intramamaria (presencia o ausencia)
- Interacciones: efecto de las interacciones dobles IMIxGAN, IMIxNPAR y IMIxEL.

La variable RCS fue analizada en log10 para normalizar su distribución.

Además, también se calcularon las correlaciones entre los tres marcadores inflamatorios, y de cada uno de ellos con el resto de las variables cuantitativas de calidad de la leche analizadas, utilizando el PROC CORR del programa informático SAS.

Para llevar a cabo el proceso de calibración, los ficheros con los registros de los espectros (para cada muestra de leche, las absorbancias en cada una de las 1060 longitudes de onda utilizadas en el infrarrojo medio: pins de 240 a 1299) se exportaban del equipo de análisis en formato ASCII (ficheros CSV). Por otra parte, los valores obtenidos para cada muestra de leche de los tres marcadores inflamatorios (valores de referencia) fueron introducidas manualmente en un fichero Excel. Estos ficheros fueron importados al programa DBASE 5, en el cual se llevó a cabo la unión de los ficheros y su exportación en un único fichero (espectros y valores de referencia) en formato ASCII (fichero TXT), utilizando el punto como separador decimal y el punto y coma como separador entre campos. El proceso de calibración se llevó a cabo con el programa WINISI IV. Para importar el fichero TXT, previamente se abría con Excel 2016 y se guardaba en formato "Texto (delimitado por tabulaciones)". El fichero importado en WinISI era guardado con la

extensión .cal . Para llevar a cabo el proceso de regresión y obtención de la ecuación de calibración se utilizó la opción del programa de “Ecuación Global” /”Desarrollo de ecuaciones con todo el espectro”, y el método de regresión de Cuadrado Mínimos Parciales (PLS modificado). Se consideró el Error de Validación Cruzada (SECV) como criterio para definir la mejor ecuación de calibración (la de menor SECV). Para ello se llevó a cabo un proceso de prueba y error modificando los siguientes apartados:

1. Número máximo de términos de la calibración PLS (máximo 16).
2. Número grupos de validación cruzada.
3. Elección de las longitudes de onda utilizadas.
4. Opciones de dispersión (5 métodos).
5. Tratamiento matemático de derivadas.

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la Tabla 1 se presenta el valor medio y el rango de variación de todas las variables cuantitativas utilizadas en el presente trabajo. El valor medio obtenido para la lactoferrina (36 µg/mL) es similar al encontrado por Hiss et al. (2008) y superior al encontrado por Barth et al. (2010). Así mismo, los valores de MAA son superiores a los obtenidos por otros autores en leche de cabra (Sequeira et al., 2014; Matuozzo et al., 2020). Por otra parte, el valor medio encontrado para el RCS (2.781×10^3 células/mL) es un valor muy elevado respecto al encontrado habitualmente en la bibliografía (Paape et al., 2007), pero puede explicarse porque los animales no fueron muestreados al azar, sino que fueron elegidos para que, en cada granja, hubiera la máxima variabilidad en este parámetro.

Tabla 1. Características de las muestras individuales de leche de cabra Murciano-Granadina utilizadas en el estudio

Variable	n	Media	DS	Mínimo	Máximo
Lactoferrina (µg/mL)	180	36	44	1	322
MAA (µg/mL)	175	57	58	3	296
RCS (x1000 células/mL)	180	2781	4128	44	29218
Nº Parto	180	3	2	1	9
Mes Lactación	180	6	3	1	15
Producción (L/día)	167	1,49	0,66	0,10	3,2
Grasa (g/100 g)	180	5,87	1,24	1,98	9,78
Proteína (g/100 g)	180	4,10	0,69	2,66	6,56
Lactosa (g/100 g)	180	4,66	0,34	1,7	5,2
Materia Seca (g/100 g)	180	9,64	0,76	7,83	11,5
pH	180	6,72	0,12	6,11	7,32

n = número de muestras; DS= Desviación Estándar; MAA = "Milk Amyloid A"; RCS = Recuento de Células Somáticas

El factor granja tuvo un efecto significativo sobre el contenido en la leche de lactoferrina ($P < 0,01$) y MAA ($P < 0,001$), pero no llegó a ser significativa para el RCS ($P > 0,05$). Este último resultado puede ser explicado por la metodología utilizada para elegir los animales que fueron muestreados, tal y como ya se ha comentado anteriormente. Las granjas 1, 3 y 5 presentaron los menores valores medios de lactoferrina y MAA, mientras que la granja 4 fue la que presentó los valores medios más elevados en ambos parámetros.

Tabla 2. Efecto de la granja sobre la concentración de marcadores inflamatorios en la leche de cabra Murciano-Granadina

Granja	Lactoferrina ($\mu\text{g/mL}$)		MAA ($\mu\text{g/mL}$)		logRCS (células/mL)	
	n	m \pm ES	n	m \pm ES	n	m \pm ES
1	26	27 \pm 10,0 ^a	26	38 \pm 11,5 ^{ac}	26	5,92 \pm 0,138
2	33	48 \pm 9,0 ^{ab}	33	86 \pm 10,3 ^{bc}	33	5,95 \pm 0,124
3	33	26 \pm 8,4 ^a	33	26 \pm 9,7 ^a	33	6,30 \pm 0,116
4	32	64 \pm 8,2 ^b	32	104 \pm 9,4 ^{bd}	32	6,22 \pm 0,113
5	26	27 \pm 10,4 ^a	23	56 \pm 12,3 ^{acd}	26	6,29 \pm 0,143
6	9	54 \pm 15,0 ^{ab}	9	66 \pm 17,3 ^{bc}	9	5,77 \pm 0,207
7	17	37 \pm 11,9 ^a	15	81 \pm 14,3 ^{bc}	17	6,13 \pm 0,164
P-Value		0,007		< 0,001		0,064

n= número de muestras; m \pm ES= media \pm Error Estándar de la media; MAA = "Milk Amyloid A"; RCS = Recuento de Células Somáticas

^{a, b, c, d}. Letras distintas en una misma columna indican diferencias significativas (P<0.05).

El factor número de parto no afectó significativamente a ninguna de las tres variables analizadas (Tabla 3). En el caso de la lactoferrina, este resultado no coincide con el encontrado por Barth et al. (2010), ya que estos autores encuentran que las cabras de primer parto presentan menores valores de lactoferrina que las cabras de dos o más partos. Respecto al MAA no se ha localizado en la bibliografía ningún trabajo que estudie el efecto del número de parto en leche de cabra.

Tabla 3. Efecto número de parto sobre la concentración de marcadores inflamatorios en la leche de cabra Murciano-Granadina.

Nº Parto	Lactoferrina ($\mu\text{g/mL}$)		MAA ($\mu\text{g/mL}$)		logRCS (células/mL)	
	n	m \pm ES	n	m \pm ES	n	m \pm ES
1	45	32 \pm 7,6	45	67 \pm 9,0	45	5,95 \pm 0,107
2+3	79	38 \pm 5,7	75	70 \pm 6,8	79	6,04 \pm 0,079
4+5	36	48 \pm 8,1	35	70 \pm 9,3	36	6,17 \pm 0,112
≥ 6	16	44 \pm 11,3	16	55 \pm 13,0	16	6,17 \pm 0,156
P-Value		0,463		0,731		0,405

n= número de muestras; m \pm ES= media \pm Error Estándar de la media; MAA = "Milk Amyloid A"; RCS = Recuento de Células Somáticas

El factor mes de lactación no afectó significativamente a la lactoferrina (P= 0,31; Tabla 4), lo cual discrepa de los resultados obtenidos por Hiss et al. (2008). Estos autores encuentran que la lactoferrina en la leche de cabra presenta valores más elevados en la etapa calostrual (primera semana post-parto) y, a continuación, permanece constante en los primeros 8 meses de lactación, pero en los meses 9 a 12 tiende a aumentar progresivamente de forma significativa. En nuestro caso, el valor medio de lactoferrina a partir del mes 8 de lactación fue ligeramente más elevado, aunque las diferencias no alcanzaron a ser significativas. Por otra parte, el mes de lactación sí que tuvo un efecto significativo sobre el marcador MAA (P<0,01) y el RCS (P<0,05),

de modo que en ambos casos se observaron aumentos significativos en las cabras que estaban en un estado de lactación más avanzado.

Tabla 4. Efecto mes de lactación sobre la concentración de marcadores inflamatorios en la leche de cabra Murciano-Granadina.

Mes Lactación	Lactoferrina ($\mu\text{g/mL}$)		MAA ($\mu\text{g/mL}$)		logRCS (células/mL)	
	n	m \pm ES	n	m \pm ES	n	m \pm ES
1+2	19	32 \pm 12,5	17	61,2 \pm 14,8 ^{ab}	19	5,77 \pm 0,172 ^a
3+4+5	71	33 \pm 5,4	68	45 \pm 6,4 ^a	71	6,02 \pm 0,075 ^{ab}
6+7+8	63	44 \pm 6,7	63	66 \pm 7,7 ^b	63	6,23 \pm 0,092 ^{bc}
≥ 9	23	52 \pm 10,7	23	90 \pm 12,3 ^b	23	6,32 \pm 0,148 ^c
P-Value		0,315		0,004		0,040

n= número de muestras; m \pm ES= media \pm Error Estándar de la media; MAA = "Milk Amyloid A"; RCS = Recuento de Células Somáticas

^{a, b, c}. Letras distintas en una misma columna indican diferencias significativas ($P < 0.05$).

En la Figura 1. se ha representado la evolución mensual de los valores medios de los tres marcadores estudiados. En general se aprecia que las tres variables tienden a aumentar con el mes de lactación, especialmente a partir del mes 8. Así mismo, también se observan disminuciones repentinas en algunos meses, lo cual puede ser debido a que se disponía de muy pocas muestras en esos meses.

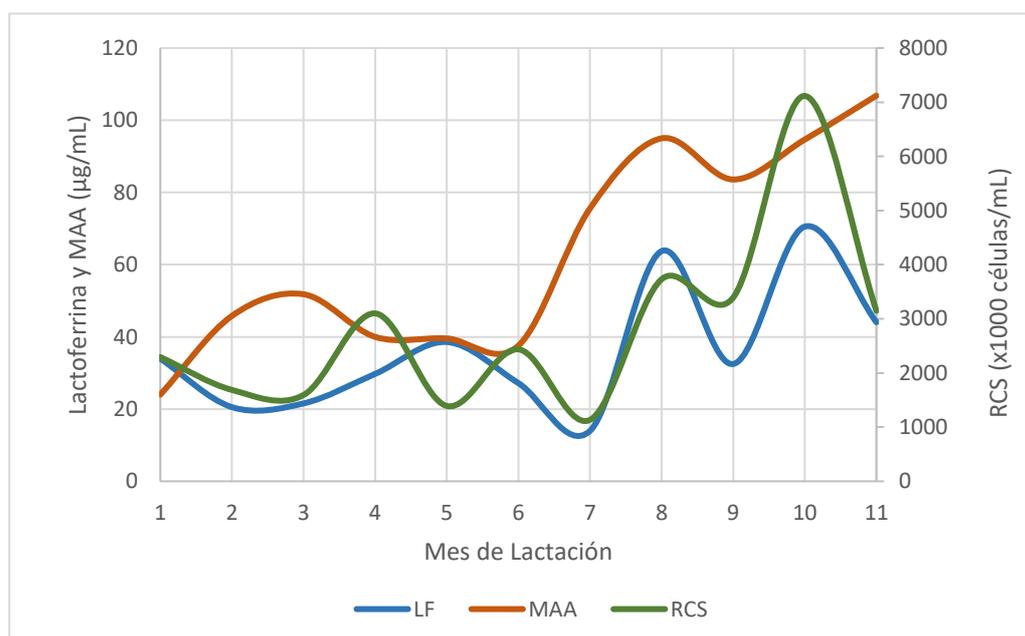


Figura 13. Evolución de los valores medios de lactoferrina, MAA y RCS a lo largo de la lactación en leche de cabra de la raza Murciano-Granadina

Las cabras con infección intramamaria, diagnosticada mediante examen bacteriológico, no presentaron una elevación significativa del contenido en lactoferrina en la leche, respecto a las cabras con ubres sanas (Tabla 5). Este resultado fue inesperado, de acuerdo con la hipótesis de partida basada en la bibliografía consultada. Sin embargo, debemos tener en cuenta que en este trabajo los muestreos fueron puntuales y, por tanto, no se podía saber cuánto tiempo llevaban

ya infectados los animales que presentaban mamitis subclínica, lo cual podría haber afectado al contenido en lactoferrina de la leche. Por ejemplo, Chen et al. (2004) encuentran que en los primeros tres días tras el inicio de la infección intramamaria la lactoferrina aumenta significativamente en la leche, pero no estudian cual es la evolución en las siguientes semanas o meses. Por otra parte, la presencia de mamitis subclínica sí que provocó un incremento significativo del marcador MAA ($P < 0,05$) y del RCS ($P < 0,05$), lo cual coincide con lo encontrado por Matuozzo et al. (2020) y Sequeira et al. (2014).

Tabla 5. Efecto de la presencia de mamitis sobre la concentración de marcadores inflamatorios en la leche de cabra Murciano-Granadina

Estado Sanitario de la ubre	Lactoferrina ($\mu\text{g/mL}$)		MAA ($\mu\text{g/mL}$)		logRCS (células/mL)	
	n	m \pm ES	n	m \pm ES	n	m \pm ES
Sana	127	37 \pm 5,3	124	56 \pm 6,1	127	5,97 \pm 0,073
Infectada	49	44 \pm 7,0	47	75 \pm 8,2	49	6,20 \pm 0,097
P-Value		0,312		0,026		0,027

n= número de muestras; m \pm ES= media \pm Error Estándar de la media; MAA = "Milk Amyloid A"; RCS = Recuento de Células Somáticas

En todas las granjas muestreadas se identificaron tan solo dos grupos de bacterias responsables de las infecciones intramamarias: *Corynebacterium spp.* y Estafilococos Coagulasa Negativa (ECN). En la Figura 16 se han representado los valores medios de lactoferrina, MAA y RCS en cada uno de estos grupos bacterianos. Se puede observar que las ubres infectadas de ambos grupos bacterianos presentaban unos valores medios superiores respecto a las ubres sanas.

Por otra parte, debemos señalar que, en los tres marcadores estudiados, ninguna de las interacciones contempladas en el modelo estadístico resultó significativa

En la Tabla 6 se presenta la matriz de correlaciones entre los tres marcadores inflamatorios estudiados y el resto de las variables cuantitativas de calidad de la leche analizadas. En general puede observarse que las correlaciones son relativamente bajas, aunque significativas en algunos casos. Podemos destacar que la lactoferrina presentó una correlación significativa con MAA ($r = 0,44$, $P < 0,001$) y el RCS ($r = 0,43$, $P < 0,001$), pero la correlación entre MAA y RCS no fue significativa ($r = 0,14$; $P > 0,05$). En las Figuras 14, 15 y 16 se aprecia visualmente que no existe una buena relación entre los estos tres marcadores en las muestras de leche de cabra estudiadas, lo cual queda reflejado en los bajos coeficientes de determinación calculados en las tres regresiones lineales realizadas ($R^2 = 0,02$ a $0,19$).

En la Tabla 6 también se observa que los tres marcadores presentaron una correlación negativa con la producción de leche ($r = -0,30$ a $-0,38$; $P < 0,001$) y la lactosa ($-0,13$ a $-0,48$), mientras que las correlaciones fueron positivas con el resto de las variables: grasa, proteína, materia seca y pH. La correlación más elevada fue entre MAA y la proteína de la leche ($r = 0,49$; $P < 0,001$). No se ha encontrado en la bibliografía información sobre este tipo de correlaciones, con objeto de poder comparar estos resultados con los de otros estudios.

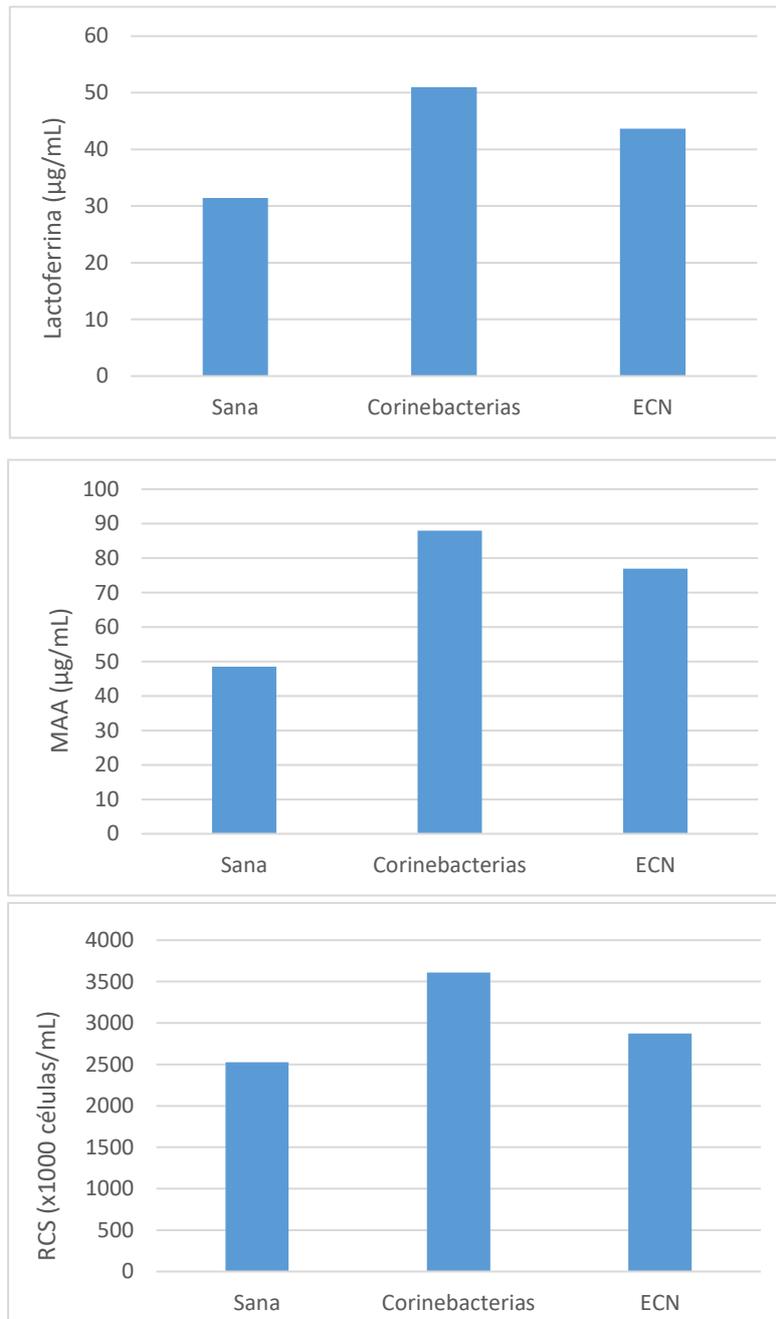


Figura 14. Valores medios de Lactoferrina, MAA y RCS en leche de cabra procedente de cabras sanas ($n=125$) y cabras afectadas de infección intramamaria según el tipo de microorganismo aislado: *Corynebacterium* spp. ($n=22$) y *Estafilococos coagulasa negativo-ECN* ($n= 29$)

Tabla 6. Coeficientes de correlación (r) entre los marcadores inflamatorios estudiados y las variables de pH y de la producción y composición en leche de cabra

Variable	Lactoferrina	MAA	LogRCS
Lactoferrina	-		
MAA	0,44***	-	
LogRCS	0,43***	0,14	-
Producción	-0,38***	-0,30***	-0,37***
Grasa	0,22**	0,32***	0,27***
Proteína	0,41***	0,49***	0,28***
Lactosa	-0,20**	-0,13	-0,48***
Materia Seca	0,30***	0,42***	0,24**
pH	0,16*	0,18*	0,19**

*P-value < 0,05; **P-value < 0,01; ***P-value < 0,001; MAA: Milk Amyloid A; RCS = Recuento de Células Somáticas

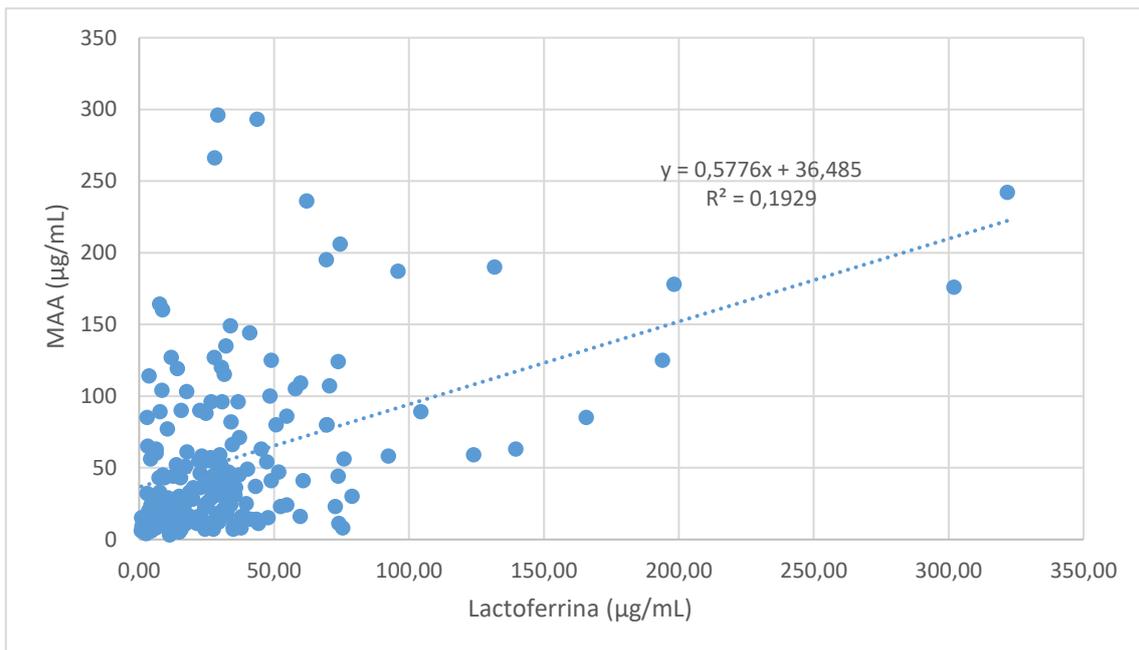


Figura 15. Relación entre lactoferrina y MAA en la leche de cabra

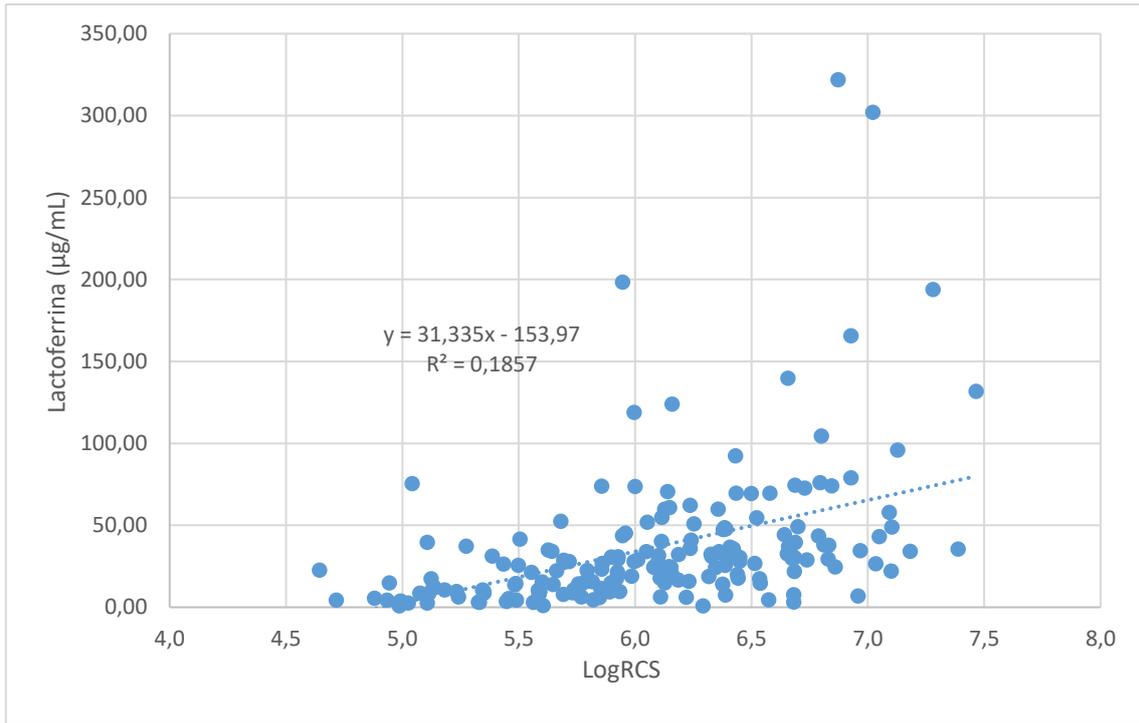


Figura 16. Relación entre lactoferrina y logRCS en la leche de cabra

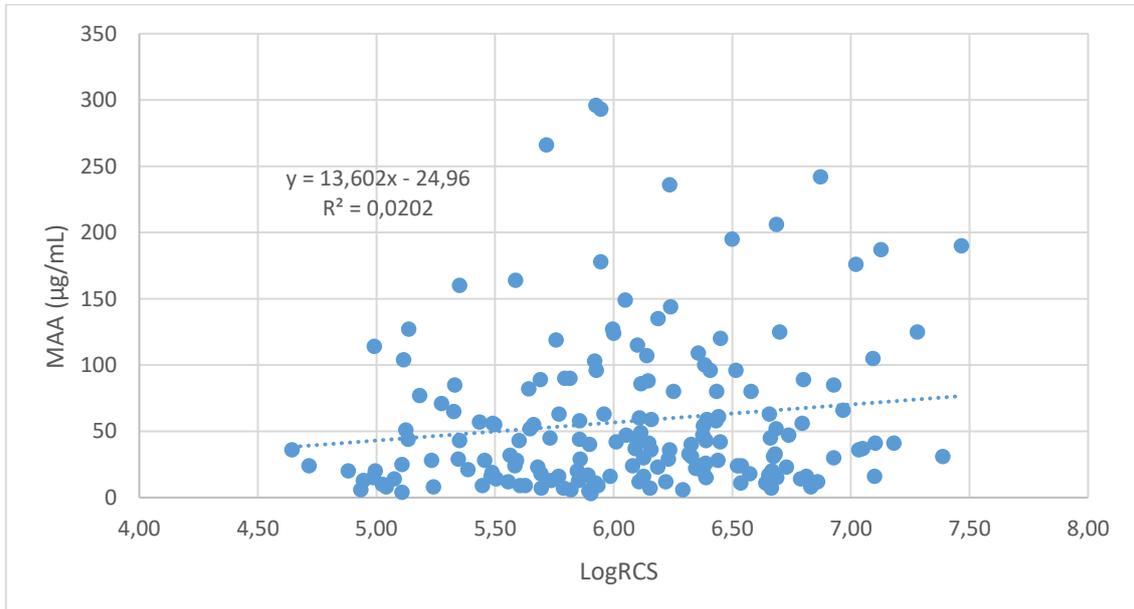


Figura 17. Relación entre el MAA y logRCS en la leche de cabra

En la Tabla 7 se muestran los resultados obtenidos en la calibración realizada para estimar la concentración de cada uno de los tres marcadores inflamatorios estudiados (lactoferrina, MAA y RCS) en la leche de cabra mediante la espectroscopía del infrarrojo medio. Puede observarse que los estadísticos obtenidos en las tres calibraciones fueron deficientes, puesto que el error estándar de la calibración (SEC) y el error estándar de validación cruzada (SECV) fueron muy elevados, mientras que el coeficiente de determinación y la varianza explicada fueron muy bajos para el MAA ($R^2=0,42$; Var. Explicada: 0,31) y la lactoferrina ($R^2=0,68$; Var. Explicada: 0,40) y moderadamente bajos para el RCS ($R^2=0,78$; Var. Explicada: 0,65). El SEC en esta última variable fue de 1.918×10^3 células/mL. En la bibliografía no se dispone de ningún trabajo que haya utilizado la espectroscopía MIR para estimar el contenido en lactoferrina y MAA en leche de cabra. Por el contrario, sí que existen dos estudios que han intentado estimar el RCS a partir de los espectros MIR en leche de cabra, pero en ambos las calibraciones obtenidas tuvieron unos parámetros de precisión peores a los encontrados en el presente trabajo. Así, Marinot y Marisal (2016) encontraron una calibración con un $R^2=0,52$ y un $SEC=2493 \times 10^3$ células/mL, mientras que Muñoz (2018) presentó una calibración con un $R^2=0,64$ y un $SEC=2589 \times 10^3$ células/mL.

Por el momento, los resultados del presente trabajo sugieren que la espectroscopía MIR no es adecuada para llevar a cabo una estimación del contenido en lactoferrina, MAA o el RCS en la leche de cabra. Dos hipótesis podrían explicar este hecho. La primera hipótesis es que la concentración de lactoferrina y MAA en la leche es tan baja que no es posible su detección de forma directa (es decir la detección de la molécula correspondiente) con la espectroscopía MIR. Por ejemplo, algunos autores (Bastin et al., 2016) sugieren que la concentración mínima de una sustancia para ser detectada por FT-MIR es de 500 ppm. En nuestro caso, la lactoferrina y MAA se encuentran en una concentración inferior a $300 \mu\text{g/mL}$, la cual equivale a 300 ppm. Por tanto, la estimación de estos marcadores a partir de los espectros MIR no puede ser directa, sino que debería ser indirecta, es decir, a partir de los cambios en la composición de la leche. Así, la presencia de una infección intramamaria provocaría, por un lado, un incremento en la leche de algunos marcadores inflamatorios (que no serían detectados) y, por otro lado, cambios en la composición química de la leche (modificación en el perfil de ácidos grasos y de las proteínas) que sí serían detectados con los espectros MIR. La segunda hipótesis que explicaría los malos resultados predictivos obtenidos en este trabajo es que, además de la mastitis subclínica, también existen otros factores de naturaleza no infecciosa (estado y número de lactación, estacionalidad, alimentación de los animales, presencia del celo...) que también influyen de forma importante sobre estos marcadores inflamatorios. Este hecho dificultaría la detección indirecta de estos marcadores inflamatorios con los espectros MIR.

Tabla 7. Características y estadísticos obtenidos en los procesos de regresión realizados para obtener las mejores calibraciones para estimar la concentración de los marcadores inflamatorios lactoferrina ($\mu\text{g/mL}$), MAA ($\mu\text{g/mL}$) y RCS ($\times 1000$ células/mL)

		Variable		
		Lactoferrina	MAA	RCS
Procedimiento Regresión	Método regresión	PLS modif.	PLS modif.	PLS modif.
	Nº Máximo de términos	16	16	16
	Nº Términos (factores) utilizados	15	5	10
	Nº Grupos validación cruzada	6	6	6
	Pin inicial	241 (929 cm^{-1})	240 (925 cm^{-1})	241 (929 cm^{-1})
	Pin final	796 (2148 cm^{-1})	750 (1971 cm^{-1})	728 (1886 cm^{-1})
	Número total de pin	189 ^a	345 ^b	271 ^c
	Método dispersión/corrección espectro	NO	NO	NO
	Derivadas	NO	NO	NO
Estadísticos	n	180	175	180
	Error estándar calibración (SEC)	25	44	1918
	Coefficiente determinación (R^2)	0,68	0,42	0,78
	Error estándar validación cruzada (SECV)	34,0	47,9	2444
	Varianza explicada (1-VR)	0,40	0,31	0,65

MAA: Milk Amyloid A; RCS: Recuento de Células Somáticas; n: número de muestras.

^a Corresponde al intervalo 241-410, cada pin y del 776-796, cada pin.

^b Corresponde a los intervalos 240-263, cada pin; 295-409, cada pin; 438-576, cada pin y del 680-750, cada pin.

^c Corresponde a los intervalos 241-414, cada pin; 437-509, cada pin y 702-728, cada pin.

V. CONCLUSIONES

Tras la evaluación de los marcadores inflamatorios lactoferrina, MAA y RCS en la leche como predictores de mastitis subclínica en ganado caprino se pueden extraer las siguientes conclusiones:

- La leche de las cabras con infección intramamaria presenta un mayor contenido de MAA y del RCS, con relación a la leche procedente de animales sanos. Sin embargo, en el caso de la lactoferrina esta diferencia no ha resultado estadísticamente significativa.
- Estos tres marcadores inflamatorios también se ven afectados por otros factores de variación como la granja (lactoferrina y MAA) y el estado de lactación de los animales (MAA y RCS) presentando, en general, mayores concentraciones en la leche a medida que avanza la lactación.
- Las calibraciones que se han obtenido para estimar la concentración de estos tres marcadores inflamatorios en leche mediante la espectroscopía FT-MIR presentan valores reducidos para los coeficientes de determinación ($R^2= 0,42-0,78$) y varianza explicada (0,31-0,65) lo que indica que no poseen la suficiente precisión para ser utilizadas con fines predictivos en las muestras del control lechero del ganado caprino.

VI. BIBLIOGRAFÍA

- ANDRESEN, H. (2001). Mastitis: prevención y control. *Revista de investigaciones veterinarias del Perú*, 12(2), 55-64.
- BARTH, K.; AULRICH, K.; MÜLLER, U. & KNAPPSTEIN, K. (2010). Somatic cell count, lactoferrin and NAGase activity in milk of infected and non-infected udder halves of dairy goats. *Small Ruminant Research*, 94(1-3), 161-166
- BASTIN, C.; THÉRON, L.; LAINÉ, A. & GENGLER, N. (2016). On the role of mid-infrared predicted phenotypes in fertility and health dairy breeding programs. *Journal of Dairy Science* 99:4080-4094.
- BHATTARAI, R. R. (2012). Importance of goat milk. *Journal of Food Science and Technology Nepal*, 7, 107-111.
- BIDOT, F. A. (2017). Composición, cualidades y beneficios de la leche de cabra: revisión bibliográfica. *Revista de Producción Animal*, 29(2), 32-41.
- CEDEÑO, C. B.; GARCÍA, B. G.; KLOPPERT, B.; VÁZQUEZ, H. C.; VÁZQUEZ, M. C. & WOLTER W; (2012). *Mastitis caprina*, (October 2012), 1–96
- CHEN, P. W.; CHEN, W. C. & MAO, F. C. (2004). Increase of lactoferrin concentration in mastitic goat milk. *Journal of veterinary medical science*, 66(4), 345-350.
- CONTRERAS, A.; LUENGO, C.; SÁNCHEZ, A. & CORRALES, J. C. (2001). Etiología de la infección intramamaria caprina en relación con los programas de control. *JORNADA CIENTIFICA DE LA SEOC*, 26, 71-83.
- DE FUENTES, N. M.; OJEDA, C. B. & ROJAS, F. S. (2008). Aplicación de la espectroscopía del infrarrojo medio en química analítica de procesos. *Bol. Soc. Quím. Méx*, 2(3), 93-103.
- DERRICK, M. R.; STULIK, D.; & LANDRY, J. M. (2000). *Infrared spectroscopy in conservation science*. Getty Publications.
- FAOSTAT, 2020. Food and Agriculture Organization of the United Nations, visto el 28/03/2021 <https://faostat.fao.org>
- GARCÍA-MONTOYA, I. A.; CENDÓN, T. S.; ARÉVALO-GALLEGOS, S. & RASCÓN-CRUZ, Q. (2012). Lactoferrin a multiple bioactive protein: an overview. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, 1820(3), 226-236.
- HISS, S.; MEYER, T. & SAUERWEIN, H. (2008). Lactoferrin concentrations in goat milk throughout lactation. *Small Ruminant Research*, 80(1-3), 87-90.
- LEITNER, G.; MERIN, U. & SILAKINOVE, N. (2004). Changes in milk composition as affected by subclinical mastitis in goats. *Journal of Dairy Science*, 87(6), 1719-1726.
- MAGRAMA, (2019). Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente. Situación de mercado sector ovino y caprino año 2019, visto el 15/07/2021. https://www.mapa.gob.es/es/ganaderia/temas/produccion-y-mercados-ganaderos/indicadoreseconomicosovinoycaprinodeleche2020_tcm30-553590.pdf

MARISSAL, H. & MARONET, C. (2016). Intérêt de l'examen Clinique mammaire et de la spectrométrie en moyen infrarouge pour le dépistage des mammites chroniques de la chèvre. *Tesis Doctoral. École Nationale Vétérinaire de Toulouse, 220 pp.*

MARTÍNEZ, N. B. & PERIS, R. C. (2002). El control lechero oficial de la cabra Murciano-Granadina en la Comunidad Valenciana (1995–2001). In *Proceedings of the XXVII Congreso Nacional y VI Internacional de la Sociedad Española de Ovinotecnia y Caprinotecnia (SEOC), Valencia, Spain* (pp. 19-21).

MATUOZZO, M.; SPAGNUOLO, M. S.; HUSSEIN, H. A.; GOMMA, A. M.; SCALONI, A. & D'AMBROSIO, C. (2020). Novel Biomarkers of Mastitis in Goat Milk Revealed by MALDI-TOF-MS-Based Peptide Profiling. *Biology, 9*(8), 193.

MCDUGALL, S., & VOERMANS, M. (2002). Influence of estrus on somatic cell count in dairy goats. *Journal of dairy science, 85*(2), 378-383.

MERIN, U.; FLEMINGER, G.; KOMANOVSKY, J.; SILAKINOVE, N.; BERNSTEIN, S. & LEITNER, G. (2008). Subclinical udder infection with *Streptococcus dysgalactiae* impairs milk coagulation properties: the emerging role of proteose peptones. *Dairy Science and Technology, 88*(4-5), 407-419.

MIGLIO, A.; MOSCATI, L.; FRUGANTI, G.; PELA, M.; SCOCCIA, E.; VALIANI, A. & MARESCA, C. (2013). Use of milk amyloid A in the diagnosis of subclinical mastitis in dairy ewes. *Journal of dairy research, 80*(4), 496-502

MUÑOZ, P. M. (2019). Evaluación de la espectroscopía del infrarrojo medio para estimar el recuento de células somáticas en muestras del control lechero del granado caprino.

NICOLAOU, N.; XU, Y., & GOODACRE, R. (2010). Fourier transform infrared spectroscopy and multivariate analysis for the detection and quantification of different milk species. *Journal of Dairy Science, 93*(12), 5651-5660.

PAAPE, M. J.; WIGGANS, G. R.; BANNERMAN, D. D.; THOMAS, D. L.; SANDERS, A. H.; CONTRERAS, A.; MORONI, P. & MILLER, R. H. (2007). Monitoring goat and sheep milk somatic cell counts. *Small Ruminant Research, 68*(1-2), 114-125.

PINA, D. I.; CARNICE, R. T. & ZANDUETA, M. C. (2003, January). Empleo de leche de cabra en pacientes con alergia a las proteínas de la leche de vaca. In *Anales de Pediatría* (Vol. 59, No. 2, pp. 138-142). Elsevier Doyma.

QUINTAS, H.; MATEUS, Ó.; MAURÍCIO, R.; MENDOÇA, Á.; ALEGRIA, N., & VALEMTIN, R. (2019). Milk amyloid a as a tool to monitoring udder health in Serrana goats. In *Book of the conference abstracts Warsaw 2019* (pp. 33-34). Faculty of Veterinary Medicine Warsaw University of Life Sciences–SGGW.

SAS INSTITUTE. *SAS User's Guide: Statics*, Version 9.2 ed.; SAS Institute Inc.: Cary, NC, USA, 2011.

SCIENTIFIC, T. (2013). Introduction to Fourier Transform Infrared Spectroscopy. *Thermo Fisher Sci. Inc., Madison, WI, USA, Tech. Rep. BR50555_E, 10.*

SEQUEIRA, A.; COELHO, A. C.; ABREU, R.; ALEGRIA, N.; MENDOÇA, Á. & QUINTAS, H. (2014). Diagnóstico de mastites subclínicas caprinas pelo método do doseamento de Amilóide A do leite.

SHARMA, N.; SINGH, N. K. & BHADWAL, M. S. (2011). Relationship of somatic cell count and mastitis: An overview. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, 24(3), 429-438.

SOYEURT, H.; MISZTAL, I. & GENGLER, N. (2010). Genetic variability of milk components based on mid-infrared spectral data. *Journal of Dairy Science* 93(4):1722-1728.