

## Termografía infrarroja como herramienta para la detección de mastitis sub-clínica en ganado lechero bovino

Jaime Enrique Curbelo Rodríguez<sup>1</sup>, Abel David Almeida Montenegro, Guillermo Ortiz Colón, Héctor Luis Sánchez Rodríguez, Esbal Jiménez Cabán

Departamento de Ciencia Animal, Universidad de Puerto Rico, Mayagüez, Puerto Rico, 00680.

### Infrared thermography as a tool for the detection of sub-clinical mastitis in bovine dairy cattle

**Abstract.** Infrared thermography (IRT) was evaluated as a means of detecting sub-clinical mastitis during the milking process, in milk samples (IRTMS) and in the short milking tubes (IRTST). During pre-milking, aseptic milk samples were collected for bacteriological and somatic cell count (SCC) analysis followed by IRTMS (n=127). During milking, data on the real temperature of the milk (RTM) and IRTST (n=129 quarters) were recorded at 30 s intervals. The RTM of the short tube and milk samples were measured with thermometer probes and used to study the association of the variables with IRT. To describe the relationship between TIR and the sensitivity of mastitis in individual mammary quarters, a scheme of classification by SCC ( $10^3$  cél.ml<sup>-1</sup>) was used: low count ( $\leq 200$ ), intermediate ( $>200 \leq 750$ ) and high ( $>750$ ). Ambient temperature (AT), relative humidity and rectal temperature of the animals were also determined. Bacteriological results were grouped by Gram-family for further analysis. No differences in mean IRT were found between low-, medium- and high-SCC ( $P > 0.05$ ). However, TIRST tended to be higher ( $P=0.0579$ ) in milk samples with Gram-positive and Gram-negative bacteria relative to samples with no bacterial growth. In conclusion, the utility of IRTMS and IRTST as a sub-clinical mastitic detection tool was limited. This could be attributed, at least in part, to diurnal AT variations [e.g.,  $r=0.69$  ( $P<0.0001$ ) between IRTST and time of day at milking]. Future studies are required to better characterize the association between IRT and mastitic pathogens.

**Keywords:** *Bos Taurus*, Infrared thermography, Mastitis, Milk temperature

**Resumen.** Se evaluó la termografía infrarroja (TIR) como herramienta de detección de mastitis sub-clínica durante el proceso del ordeño en muestras de leche (TIRM) y en tubos cortos de la unidad de ordeño (TIRT). Durante el pre-ordeño, se colectaron muestras asépticas de leche para determinar el recuento de células somáticas (RCS) y bacteriología, seguido por TIRM (n=127). Durante el ordeño, la temperatura real de la leche (TRL) y TIRT (n=129) fueron registradas a intervalos de 30s. Se determinó la TRL en los tubos cortos y muestras de leche durante la colección de datos de TIRT y TIRM usando termómetros de sonda, para establecer su asociación con TIR. La determinación de la asociación entre la TIR y el grado de mastitis por cuarto empleó la categorización según su RCS ( $10^3$ cél.ml<sup>-1</sup>) en bajo ( $\leq 200$ ), intermedio ( $>200 \leq 750$ ) y alto ( $>750$ ). También se determinó la temperatura ambiental (TA), humedad relativa y temperatura rectal de los animales. Resultados bacteriológicos fueron agrupados por familia-Gram para análisis posterior. No se encontraron diferencias en TIR según los diferentes niveles del RCS ( $P>0.05$ ). Sin embargo, la TIRT tendió a ser mayor ( $P=0.0579$ ) en muestras donde se aislaron bacterias Gram-negativas y Gram-positivas relativo a muestras carentes de crecimiento bacteriano. En conclusión, la utilidad de TIRM y TIRT como herramienta de diagnóstico de mastitis subclínica fue limitada. Atribuible entre otros

Recibido: 2017-03-22; Aceptado: 2017-08-27

<sup>1</sup> Autor para la correspondencia: Jaime Curbelo [jaimee.curbelo@upr.edu](mailto:jaimee.curbelo@upr.edu)

factores, a variaciones diurnas de TA durante el ordeño [e.g.,  $r=0.69$  ( $P<0.0001$ ) entre TIRT y hora de ordeño]. Estudios futuros deberán caracterizar mejor la asociación entre la TIR y patógenos mastíticos.

**Palabras clave:** *Bos Taurus*, Mastitis, Muestras de leche, Termografía infrarroja

## Introducción

La mastitis es la enfermedad más importante en muchos hatos lecheros mundialmente. Su efecto negativo abarca la salud del animal, y la cantidad y calidad de leche producida (Geary *et al.*, 2012). El proceso infecciones de mastitis microbial comienza con la colonización del patógeno al tejido mamario estéril, luego de que el patógeno evade la primera línea de defensa de la ubre (*i.e.*, esfínter del pezón). Los antígenos asociados al microorganismo invasor activan la cascada de eventos asociados con la producción de mediadores pro-inflamatorios (Harmon, 1994). Estos procesos generalmente resultan en un incremento de perfusión de sangre local como modo de infiltrar células inmunológicas al área de insulto, ocasionando un aumento en la temperatura (Montero-González *et al.*, 2001; García-Barreno, 2008). En este punto, la concentración de células inmunológicas en la leche (recuento de células somáticas; RCS) ha sobrepasado ampliamente el nivel superior deseable en leche normal de 200 000 células/mL, generalmente alcanzando los millones. Existen varios métodos aplicables a nivel de campo para estimar el RCS y por ende el grado de infección. 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). Polat *et al.* (2010) concluyeron que la TIR es servible como herramienta rápida para detectar cambios en la temperatura superficial de la glándula mamaria, asociada a la mastitis. Sin embargo, estos autores encontraron que factores externos como la temperatura ambiental (TA), humedad relativa (HR), radiación solar y velocidad del viento (VV) influyen la temperatura de la piel, por lo que deben ser considerados al momento de la toma de imágenes (Colak *et al.* 2008; Hovinen *et al.* 2008; Polat *et al.* 2010). En adición, contaminación de la piel de la glándula mamaria (*e.g.*, agua, heces, materia orgánica y orina) pueden interferir con la lectura de radiación infrarroja (Curbelo-Rodríguez, 2011), reduciendo la capacidad de estimar la temperatura de la superficie de la misma. Por estas razones, otros objetivos de imagen deberían ser evaluados para identificar la presencia de mastitis, en especial de tipo subclínica. A tales efectos, imágenes termográficas (IT) de muestras de leche y componentes de la unidad de ordeño que tengan contacto directo con ésta (*e.g.*, tubos cortos de la unidad de ordeño) podrían utilizarse para estimar la temperatura de la leche de cada cuarto mamario simultáneamente y de manera práctica.

## Materiales y Método

### Descripción del lugar y parámetros ambientales evaluados

La investigación fue realizada en un hato lechero comercial ubicado en el municipio de Lajas, Puerto Rico (Latitud: 18° 01'55" N, Longitud 67° 04'18" O, con una elevación de 26 msnm). Los valores (promedios  $\pm$  error estándar) de temperatura ambiental (TA), humedad relativa (HR) y velocidad del viento (VV) del lugar durante el periodo de estudio fueron  $24.00 \pm 4.20^\circ\text{C}$ ,  $71.01 \pm 16.53\%$  y  $0.3 \pm 0.1$  m/s, respectivamente. Las lecturas de TA y HR en la sala de ordeño y de espera fueron recopilados desde 48 horas antes y durante el periodo de prueba utilizando un termómetro U23-01 HOBO Data Logger (Onset®;

Massachusetts, USA). La VV en la sala de ordeño se determinó a intervalos de 10 min empleando un anemómetro (Thermo Fisher Scientific Inc.; Massachusetts, USA). Diariamente la cámara termográfica FLIR e-50 (FLIR Systems, Inc.; Oregon, USA) se calibró según los valores de TA y HR de la sala de ordeño. Se utilizó una emisividad de 0.98 y temperatura reflejada (reflectividad) de 0.73 para la toma de IT de la leche y de los componentes de la unidad de ordeño.

Categorización de cuartos mamaros según el recuento de células somáticas y colección de muestras de leche para análisis bacteriológicos.

Se incluyeron 142 cuartos mamaros totales correspondientes a 48 vacas lactantes de las razas

Holstein, Jersey o sus cruces con  $113 \pm 11$  días en leche (DEL). Previo al día de prueba, se realizó una pre-categorización de los cuartos mamarios estimando el RCS a base de la conductividad eléctrica (CE; Afimilk Ltd., Kibbutz Afikim, Israel) por animal durante el ordeño anterior. El día de prueba, cada cuarto mamario de vacas con valores de CE mayores a 5 milliSiemens (Norberg *et al.* 2004) fue evaluado utilizando el CMT para distinguir entre los cuartos mastíticos o saludables. Una muestra de leche (5 mL) de estos cuartos se colectó para la determinación *in situ* del RCS utilizando el DeLaval cell counter (DeLaval Tumba, Sweden) y así categorizarlos según su RCS ( $10^3$  cél.ml<sup>-1</sup>) en cuartos con recuentos-bajo ( $\leq 200$ ), intermedio ( $> 200 \leq 750$ ) y alto ( $> 750$ ). Una vez categorizados los cuartos, se procedía con la desinfección de los pezones con solución desinfectante (Whisper™ V, Ecolab). Luego se realizó el despunte (4-5 chorros) en una taza con fondo negro para examinar la apariencia de la leche, seguido por el secado de pezones con una toalla de tela individual por vaca. Únicamente se incluyeron en el estudio cuartos libre de mastitis clínica. De la ubre ya preparada se tomó una muestra aséptica de leche (10 mL) de los cuartos experimentales, siguiendo las recomendaciones del *Microbiological Procedures for the Diagnosis of Bovine Udder Infection and Determination of Milk Quality* (2004). Cada muestra de leche fue almacenada en hielo y mantenida aproximadamente a 4.0° C durante un periodo no mayor a 48 h previo a su envío al laboratorio comercial de Calidad de Leche (Capaez, Hatillo, Puerto Rico) para efectuar identificación de patógenos y número de unidades formadoras de colonias (UFC).

#### **Toma de imágenes termográficas de muestras de leche y componentes de la unidad de ordeño**

En una muestra de leche procedente de cada cuarto experimental se determinó la temperatura infrarroja (TempIR) durante el proceso de la preparación de la ubre. Se ubicó la muestra en una paleta CMT modificada (Figura 1A). Cada taza tenía instalada una sonda termal HYP2-21-1/2-T-G-48-OSTW-M (OMEGA Engineering Inc.; Connecticut, USA) conectada a un termómetro de cuatro canales HH147U almacenador de datos (OMEGA Engineering Inc.; Figura 1A). Así se determinó la determinación de la temperatura real de la leche (TrealM) en cada cuarto experimental en tiempo real. La determinación de la TrealM y TempIR de cada muestra (a una

distancia de 0.6 m de la paleta CMT) se realizó simultáneamente para correlacionar ambas lecturas (Figura 1C).

Para determinar la temperatura real de la leche de los cuartos experimentales que fluía a través de los tubos cortos de la unidad de ordeño (TrealT), a cada tubo corto se le introdujo una sonda termal HYP3-16-1-1/2-T-U-48-RP conectada a un termómetro cuatro canales HH147U almacenador de datos (adicional al utilizado en la paleta CMT modificada). La temperatura de la leche se midió en tiempo real desde el comienzo del ordeño hasta el retirado de la unidad de ordeño utilizando el programa "Temp Monitor\_S2 OMEGA". Las IT se realizaron desde 1.5 min después de haber iniciado el ordeño (asegurando así la estabilización de la transferencia de calor entre la leche y el tubo corto; datos no presentados) en intervalos de 30 seg hasta finalizado el mismo. Las imágenes se tomaron a una distancia de 1.5 m de tal forma que los cuatro tubos cortos fueran capturados simultáneamente (Figura 1D). Una vez finalizado el proceso de ordeño, se determinó la temperatura rectal (TRectal) de cada vaca por medio de un termómetro digital GLA Agricultural Electronics Modelo 525-550 (San Luis Obispo, CA) con una sonda de acero inoxidable de 11.43 cm de largo. La toma de datos se realizó durante la rutina normal de ordeño atendiendo un solo animal a la vez. Como modo de evitar sesgos experimentales, las personas que realizaron el CMT, el RCS con el DCC y TI fueron diferentes.

#### **Análisis estadístico**

Las variables clasificatorias consideradas en el modelo estadístico incluyeron las asociadas con el grado de mastitis (*i.e.*, puntuación del CMT, RCS, UFC/ml), parámetros de desempeño animal [*i.e.*, TRectal, producción de leche (kg/ordeño), DEL; y ambientales (*i.e.*, HR y TA). Las variables dependientes incluyeron las asociadas con el perfil térmico de la leche (*i.e.*, TIRM, TrealM, TIRT y TrealT). Las variables de RCS y UFC fueron transformadas a recuento lineal de células somáticas (RLCS) usando la función logaritmo base 2 [ $RLCS = \text{Log}_2(RCS \cdot 100,000^{-1}) + 3$ ] y logaritmo natural de UFC (LnUFC) mediante la siguiente transformación [ $\text{LnUFC} = \text{Ln}(UFC)$ ], respectivamente. Las medias de cada una de las variables fueron analizados con un modelo lineal general mixto (GLIMMIX; SAS Institute, Cary, NC, USA) y comparados entre los grupos de categorización según RCS-bajo, RCS-intermedio y RCS-alto;



Figura 1. Paleta de CMT modificada (panel A) y unidad de ordeño (panel B) modificadas con sonda termal (HYP3-16-1-1/2-T-U-48-RP) en cada taza y tubo corto, respectivamente. Representación de la toma de imágenes termográficas en muestras de leche (panel C) y unidad de ordeño (panel D) usando la cámara termográfica FLIR modelo E-50.

cuartos mamarios [delantero derecho, delantero izquierdo, trasero derecho, trasero izquierdo] y patógenos. Además se evaluó la normalidad y varianzas homogéneas de todas las variables usando el proc GLIMMIX/student panel. Se utilizó el cuarto mamario como variable aleatoria.

La prevalencia de patógenos mastíticos, independientemente de la clasificación del RCS ( $n=94$ ) fue determinada utilizando un PROC FREQ. Las variables LnUFC, RLCS, TRealM, TIRM, TRealT y TIRT fueron correlacionadas entre sí utilizando un

PROC CORR. En el caso de que las variables mostraran diferencias significativas para la categorización de RCS, cuarto mamario o patógeno, se realizó una comparación de medias con la opción LS-MEANS PDIFF/adjust Tukey ( $\alpha = 0.05$ ). En adición, las correlaciones entre cada una de las variables categóricas y los datos ambientales (TA y HR) fueron estudiadas usando un PROC CORR (SAS 9.3, 2010). Las correlaciones utilizadas fueron a base de la función del coeficiente de correlación lineal de Pearson ( $r$ ).

## Resultados y Discusiones

### Parámetros asociados con el desempeño animal y grado de mastitis

Las variables de desempeño animal se analizaron según la categorización como RCS-bajo, -intermedio y -alto. La producción de leche por ordeño fue mayor ( $P < 0.002$ ) en el grupo de RCS-bajo relativo a las demás categorizaciones del RCS (Tabla 1); mientras esta variable difirió entre los grupos de RCS-intermedio y -alto. Estos resultados concuerdan con observaciones de Hand *et al.* (2012), de que animales con  $RCS \leq 200 \times 10^3$

y  $> 2.0 \times 10^6$  células/mL. En el presente estudio se observó una correlación negativa ( $r = -0.24$ ;  $P = 0.012$ ) entre la producción de leche y el RLCS (datos no expuestos). Esto concuerda con observaciones de Hinrichs *et al.* (2005) y es indicativo del impacto adverso de la mastitis sobre la síntesis de leche. La TRectal de las vacas no difirió ( $P = 0.13$ ) entre los grupos de clasificación según el RCS, lo cual era de esperarse en vacas con mastitis subclínica (Plastridge, 1958; Harmon, 1994).

Tabla 1. Las medias  $\pm$  error estándar de los parámetros de desempeño según el recuento de células somáticas

Variables	Categorización según el RCS (células/mL) $\cdot 10^3$					
	Bajo $\leq 200$	n	Intermedio $>200$ a $\leq 750$	n	Alto $>750$	n
DEL	116.00 $\pm$ 9	62	108 $\pm$ 18	16	115 $\pm$ 12	36
Prod, kg <sup>1</sup>	10.95 $\pm$ 0.33 <sup>a</sup>	67	7.75 $\pm$ 0.64 <sup>b</sup>	18	8.62 $\pm$ 0.49 <sup>b</sup>	31
T rectal, °C <sup>2</sup>	38.33 $\pm$ 0.05	69	38.24 $\pm$ 0.09	20	38.46 $\pm$ 0.07	36

<sup>a,b</sup>Promedios con diferentes letras en la misma fila son significativamente diferentes (Prueba de Tukey-Kramer;  $P < 0.05$ ).

<sup>1</sup>Producción de leche por ordeño.

<sup>2</sup>Temperatura rectal de los animales en ° C.

Las medias  $\pm$  error estándar de los parámetros asociados con el grado de mastitis (RLCS, CMT y LnUFC), según las categorizaciones del RCS, se presentan en la Tabla 2. El RLCS y CMT difirieron entre cada categorización del RCS ( $P < 0.01$ ). Lógicamente los cuartos mamarios categorizados como RCS-bajo presentaron los menores valores de LnUFC mientras los valores para los RCS-intermedio y -alto no difirieron entre sí ( $P > 0.05$ ), con valores de 4.08 y 4.31 LnUFC/mL, respectivamente. Esto podría deberse a que los animales con altos RCS pudieron estarían bajo tratamiento terapéutico contra la mastitis disminuyendo así el número de células bacterianas viables (LnUFC).

#### Temperatura infrarroja de muestras de leche y componentes de la unidad de ordeño

La TrealM, TrealT, TIRM y TIRT no fueron diferentes entre las categorías del RCS ( $P > 0.05$ ; Tabla 3). Polat *et al.* (2010), observaron un incremento en la temperatura termográfica de la superficie de la ubre de 33.23 a 36.27° C a medida que el RCS se incrementaba de  $6.5 \times 10^4$  a  $3.6 \times 10^6$

células/mL. También Colak *et al.* (2008) observaron semejante incremento de la ubre de 33.19 a 36.15° C al aumentar los valores de CMT de 0 a 3. Durante la progresión de mastitis bacteriana, la perfusión de sangre hacia la glándula mamaria aumenta (Dohoo and Meek 1982; Harmon 1994). Como consecuencia se intensifica la migración de citosinas proinflamatorias desde la sangre hacia el cuarto afectado, ocasionando a su un incremento en la temperatura de la leche asociado con transferencia del calor interno del animal (Montero *et al.* 2001; García-Barreno, 2008). Sin embargo, en el presente estudio este aumento en temperatura no pudo ser detectado por la tecnología infrarroja implementada. Se ha señalado a factores ambientales o de desempeño animal como influyentes indirectamente en la temperatura de la leche (Polat *et al.*, 2010). Varios otros factores como el agente etiológico, estado fisiológico del animal y estado de la infección pudieran incidir también en el grado de inflamación mamaria y por ende la temperatura de la leche. Por ejemplo, mastitis

Tabla 2. Las medias  $\pm$  error estándar de los parámetros asociados con el grado de mastitis según el recuento de células somáticas

Variables	Categorización según el RCS (células/mL) $\cdot 10^3$					
	Bajo $\leq 200$	n	Intermedio $>200$ a $\leq 750$	n	Alto $>750$	n
RLCS <sup>1</sup>	1.10 $\pm$ 0.15 <sup>c</sup>	67	4.80 $\pm$ 0.32 <sup>b</sup>	18	7.16 $\pm$ 0.20 <sup>a</sup>	42
CMT <sup>2</sup>	0.07 $\pm$ 0.09 <sup>c</sup>	67	0.91 $\pm$ 0.18 <sup>b</sup>	18	2.18 $\pm$ 0.12 <sup>a</sup>	42
LnUFC <sup>3</sup>	0.98 $\pm$ 0.55 <sup>b</sup>	41	4.08 $\pm$ 1.0 <sup>a</sup>	13	4.31 $\pm$ 0.68 <sup>a</sup>	27

<sup>a,b,c</sup>Promedios con diferentes letras en la misma fila son significativamente diferentes (Prueba de Tukey-Kramer,  $P < 0.05$ ).

<sup>1</sup>Recuento lineal de células somáticas.

<sup>2</sup>Prueba de mastitis californiana con sus siglas en inglés.

<sup>3</sup>Transformación logarítmica de unidades formadoras de colonias.

Tabla 3. Las medias  $\pm$  error estándar de la temperatura real y termográfica de muestras de leche y tubos cortos de la unidad de ordeño según la categorización del RCS

Variables, °C	Categorización según el RCS (células/mL) $\cdot 10^3$		
	Bajo $\leq 200$ (n=67)	Intermedio $>200$ a $\leq 750$ (n=18)	Alto $>750$ (n=42)
TIRM <sup>1</sup>	34.43 $\pm$ 0.12	34.53 $\pm$ 0.23	34.66 $\pm$ 0.51
TrealM <sup>2</sup>	34.67 $\pm$ 0.11	34.90 $\pm$ 0.21	34.82 $\pm$ 0.14
TIRT <sup>3</sup>	33.42 $\pm$ 0.20	32.98 $\pm$ 0.38	33.57 $\pm$ 0.28
TrealT <sup>4</sup>	38.36 $\pm$ 0.06	38.26 $\pm$ 0.12	38.29 $\pm$ 0.10

<sup>1</sup>Termografía infrarroja máxima de las muestras de leche.

<sup>2</sup>Temperatura real de las muestras de leche.

<sup>3</sup>Termografía infrarroja máxima de los tubos corto de la unidad de ordeño.

<sup>4</sup>Temperatura real de los tubos corto de la unidad de ordeño.

causada por bacterias Gram-negativas tiende a desarrollar mastitis clínica aguda, lo cual está asociado a una mayor expresión de citoquinas inflamatorias como TNF- $\alpha$  y IL-1 $\beta$ , relativo a bacterias Gram-positivas (Wellnitz *et al.* 2011).

#### Correlaciones entre la temperatura infrarroja y real de la leche y tubos cortos de la unidad de ordeño con las variables ambientales y de desempeño animal

La correlación calculada entre la TrealM y TIRM fue de 0.58 ( $P < 0.0001$ ; Tabla 4). La asociación moderada entre estas variables pudiera deberse a la influencia de las condiciones ambientales sobre la temperatura de la leche. Sin embargo, la TrealM presentó una correlación de -0.25 ( $P < 0.005$ ) y 0.25 ( $P < 0.004$ ) con la TA y HR respectivamente (Tabla 4), lo cual pudiera deberse a la correlación inversas entre TA y HR. West *et al.* (2003) hallaron que las variables que más influenciaron la temperatura de la leche durante los ordeños matutinos y vespertino fueron la TA mínima ( $r = 0.13$ ) y la promedio ( $r = 0.34$ ), respectivamente. La TIRM no estuvo asociada ( $P > 0.05$ ) con las variables ambientales (Tabla 4), en cambio acusó influencia de la actividad y descanso del animal ( $P < 0.05$ ), con correlaciones correspondientes de 0.26 y -0.24. De relevancia a esto son las observaciones de Berry *et al.* (2003), de que la temperatura de la superficie de la ubre incrementó 1.0° C cuando los animales fueron sometidos a un periodo de actividad o ejercicio. La TIRM y TrealM del presente caso no dieron correlaciones significativas ( $P < 0.05$ ) con los parámetros de mastitis (*i.e.*, RLCS y CMT; Tabla 5).

La TIR presentó una correlación de 0.23 ( $P = 0.013$ ) con la TrealT (Tabla 4). La baja asociación entre estas variables, contrario a lo esperado, pudo deberse a que por un lado la TIRT acusó efectos de la duración del ordeño ( $r = 0.40$ ;  $P < 0.0001$ ) y la hora a la cual se ordeñaba cada animal ( $r = 0.69$ ;  $P < 0.0001$ ). Adicionalmente, la TIRT correlacionó positivamente con la TA ( $r = 0.72$ ;  $P < 0.0001$ ) pero negativamente con la HR ( $r = -0.62$ ;  $P < 0.0001$ ). Sin embargo, la TrealT no correlacionó con las variables ambientales (Tabla 4), pero sí presentó una correlación positiva ( $r = 0.45$ ) con la TRectal ( $P < 0.001$ ), lo que pudiera ser un reflejo de la alta vascularización de la glándula mamaria (West *et al.*, 1999). En adición, la TrealT presentó una correlación positiva con la producción de leche ( $r = 0.27$ ;  $P < 0.005$ ), lo cual es un resultado lógico del mayor metabolismo asociado con mayor producción de leche. Igono *et al.* (1985) compararon vacas de dos niveles productivos promedios de 6.1 y 15.9 kg de leche/día y encontraron temperaturas de la leche de 37.4 y 39.1° C, respectivamente.

#### Efecto del patógeno mastítico sobre la temperatura de la leche

Los resultados bacteriológicos determinados de los cuartos mamarios analizados (n=94) se presentan en la Figura 2. Este perfil bacteriano coincide con hallazgos de Wilson *et al.*, (1997), Barkema *et al.*, (1998) y Bradley (2002) quienes han encontrado que entre 75 y 80% de los casos de mastitis son causados por coliformes, *Streptococcus* (*St.*) *ambientales*, *Staphylococcus* (*S.*) *aureus*, y *S. Coagulasa Negativa*. Se evaluaron los promedios del LnUFC y RLCS mientras que con excepción de

Tabla 4. Correlaciones simples entre la temperatura infrarroja de la leche y de tubos cortos y temperatura real de la leche y tubos cortos con las variables ambientales y de desempeño animal

Variables	TIRM		TIRT		TrealM		TrealT	
	r	Valor - P	r	Valor - P	r	Valor - P	r	Valor - P
RLCS <sup>1</sup>	0.09	0.3268	0.15	0.1082	0.12	0.1824	-0.03	0.7673
CMT <sup>2</sup>	0.17	0.0536	0.08	0.3667	0.14	0.1289	0.03	0.7046
TIRM <sup>3</sup>	1.00	-	-	-	0.58	< 0.0001	-	-
TIRT <sup>4</sup>	-	-	1.00	-	-	-	0.38	< 0.0001
TrealM <sup>5</sup>	0.58	< 0.0001	-	-	1.00	-	-	-
TrealT <sup>6</sup>	-	-	0.23	0.013	-	-	1.00	-
TRectal <sup>7</sup>	-0.03	0.7613	0.58	< 0.0001	-0.11	0.2114	0.45	< 0.0001
Producción <sup>8</sup>	-0.08	0.3885	-0.04	0.7143	0.02	0.8055	0.27	0.0055
Actividad <sup>9</sup>	0.26	0.0122	-0.15	0.1584	0.1	0.3532	-0.03	0.8124
Descanso <sup>10</sup>	-0.24	0.0253	-0.01	0.9388	0.02	0.8828	-0.16	0.1418
Tambiental <sup>11</sup>	-0.12	0.1709	0.72	< 0.0001	-0.25	0.0048	0.14	0.1167
HR <sup>12</sup>	0.09	0.3019	-	-	0.25	0.0043	-	-
ITH <sup>13</sup>	-0.14	0.1285	-	-	-0.23	0.0079	-	-
Tordeño <sup>14</sup>	-	-	0.40	< 0.0001	-	-	0.38	< 0.0001
Hordeño <sup>15</sup>	-	-	0.69	< 0.0001	-	-	0.07	0.442

<sup>1</sup>Recuento lineal de células somáticas.

<sup>2</sup>Prueba de mastitis californiana (por su siglas en inglés).

<sup>3</sup>Temperatura infrarroja promedio de las muestras de leche.

<sup>4</sup>Termografía infrarroja promedio de los tubos cortos.

<sup>5</sup>Temperatura real de las muestras de leche.

<sup>6</sup>Temperatura real de la leche a través del tubo corto.

<sup>7</sup>Temperatura rectal.

<sup>8</sup>Producción de leche (kg/ordeño).

<sup>9</sup>Número de pasos determinado por podómetro.

<sup>10</sup>Periodo donde no se registran pasos determinado por podómetro.

<sup>11</sup>Temperatura ambiental.

<sup>12</sup>Humedad relativa.

<sup>13</sup>Índice de temperatura y humedad.

<sup>14</sup>Tiempo que duró el ordeño/vaca.

<sup>15</sup>Hora a la que se ordeñó la vaca.

cuartos afectados por *Pseudomonas*, hubo buen acuerdo entre los resultados de Treal y TIRM

Debido al limitado número de observaciones, por tipo de patógeno causante de mastitis (Tabla 5), estos se agruparon por familia Gram (*i.e.*, Gram positivos y negativos) en adición a muestras donde no se observó actividad bacteriana (no-crecimiento) para comparar estos tres casos en temperatura y parámetros de calidad de la leche (Tabla 6). La TIRT y TrealT tendieron a ser mayores en muestras de leche positivas para patógenos mastíticos relativo a las desprovistas de crecimiento bacteriano. Como era de esperarse, el RLCS y LnUFC también fueron mayores en muestras donde se aislaron patógenos relativo a muestras donde no hubo crecimiento; sin embargo, las familias Gram no difirieron entre sí ( $P > 0.05$ ). En un estudio de mastitis experimentalmente inducida, Wellnitz *et al.* (2011) encontraron diferencias en la respuesta inmunológica entre mastitis causada por Gram negativa [utilizando lipopolisacáridos (LPS) pro-

veniente de células de *E. coli*] y Gram positiva [utilizando ácido lipoteicoico (ALT) proveniente de *S. aureus*]. La expresión de moléculas proinflamatorias TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-8 fue mayor en el primer caso, por lo que se esperaría una mayor temperatura de la leche en cuartos con mastitis inducida con LPS (Gram negativa). Debido a que el efecto del patógeno específico sobre la temperatura de la leche no fue contemplado como objetivo principal del presente estudio, el número de muestras donde se aislaron bacterias Gram negativas fue limitado, lo que pudiera en parte explicar la falta de diferencias en temperatura.

Las correlaciones del RLCS con la TrealM y TIRM en las muestras mostrando aislamiento de patógenos fueron de 0.71 ( $P = 0.0478$ ) y 0.72 ( $P = 0.04$ ), respectivamente (Tabla 7). En adición, el RLCS se correlacionó con la TrealT y TIRT con coeficientes de 0.19 ( $P = 0.6433$ ) y 0.84 ( $P = 0.0086$ ), respectivamente. Varios autores concuerdan en que el patrón de comportamiento de mastitis es

Tabla 5. Las medias de las variables asociadas al grado de mastitis y temperatura de la leche según el resultado bacteriológico

Resultado	n	LnUFC <sup>1</sup>	RLCS <sup>2</sup>	TrealM <sup>3</sup>	TIRM <sup>4</sup>	TrealT <sup>5</sup>	TIRT <sup>6</sup>
<i>Bacilo GP</i>	2	9.77±1.17	7.14±1.83	34.81±0.80	35.76±0.82	38.35±1.04	34.60±2.02
ECN	15	7.55±0.43	4.78±0.67	35.06±0.29	34.76±0.30	37.29±0.39	32.67±0.52
Coliformes	2	7.65±1.17	5.11±1.83	34.35±0.80	34.80±0.82	38.90±1.04	34.15±1.43
Contaminados	8	2.66±0.58	2.60±0.91	35.01±0.40	34.61±0.41	37.32±0.52	31.86±0.71
<i>Strep. ambientales</i>	2	5.64±1.17	1.64±1.82	34.15±0.80	33.50±0.82	38.2±1.04	32.70±1.43
No crecimiento	57	0.00±0.00	2.83±0.34	34.50±0.15	34.26±0.15	37.95±0.20	32.72±0.27
<i>Pseudomonas</i>	2	6.47±1.17	7.68±1.83	36.21±0.80	34.41±0.82	38.40±1.04	34.15±1.43
<i>S. aureus</i>	4	5.93±0.83	6.95±1.29	35.68±0.56	35.74±0.58	37.37±0.74	33.90±1.00
Otros	2	9.77±1.17	7.35±1.83	34.89±0.80	35.14±0.82	38.50±1.48	30.55±1.43

<sup>1</sup>Transformación logarítmica de unidades formadoras de colonias.

<sup>2</sup>Recuento lineal de células somáticas.

<sup>3</sup>Temperatura real de la muestra de leche.

<sup>4</sup>Temperatura infrarroja de la muestra de leche.

<sup>5</sup>Temperatura real de la leche a través del tubo corto.

<sup>6</sup>Temperatura infrarroja de la superficie del tubo corto de la unidad de ordeño.

dependiente del tipo de patógeno y del tiempo de infección (de Haas *et al.*, 2002; de Haas *et al.*, 2004). La falta de asociación entre la TrealT y el RLCS pudiera deberse a variaciones en el flujo de leche dentro de los tubos cortos durante el ordeño, lo cual podría reducir el contacto de esta con la sonda del termómetro.

En conclusión, la temperatura real de las muestras de leche se vio afectada por las variables ambientales (TA y HR), limitando así la capacidad de la TIR como herramienta discriminatoria entre cuartos saludables o mastíticos. La temperatura

real de la leche medida a través de los tubos cortos se vio influenciada por la TRectal del animal y esta a su vez por los cambios en la TA y HR. Sin embargo, al tomar en consideración el tipo de patógeno mastítico, se observó una alta correlación entre las variables de TIR y el grado de inflamación de la glándula mamaria (RLCS). Futuros estudios con un mayor número de observaciones son necesarios para evaluar posibles diferencias en TIR entre la leche de cuartos con mastitis Gram negativa vs Gram positiva.

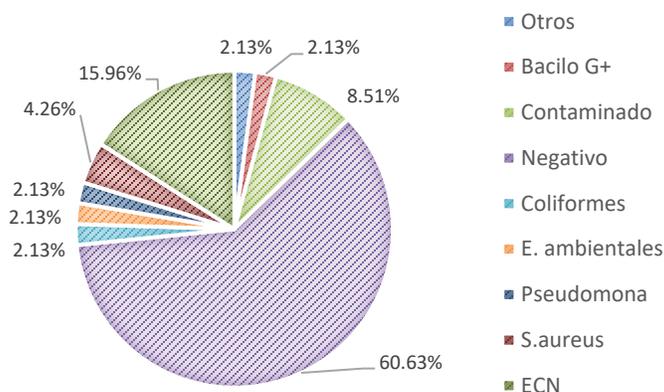


Figura 2. Prevalencia de patógenos mastíticos en el hato lechero comercial evaluado

Tabla 6. Variables asociadas al grado de mastitis y temperatura de la leche a través de los tubos cortos según el resultado bacteriológico

Resultado Bacteriológico	n	RLCS <sup>1</sup>	lnUFC <sup>2</sup>	TrealT <sup>3</sup>	TIRT <sup>4</sup>
No Crecimiento	47	3.08 ± 0.43 <sup>b</sup>	0.0±0.0 <sup>b</sup>	34.63 ± 0.14	35.12 ± 0.15
Gram positivas	21	5.03 ± 0.60 <sup>a</sup>	7.17±0.55 <sup>a</sup>	35.16 ± 0.17	35.70 ± 0.21
Gram negativas	4	5.23 ± 0.59 <sup>a</sup>	7.22 ± 0.58 <sup>a</sup>	35.17 ± 0.43	35.75 ± 0.20
P-value		0.0127	<0.0001	0.083	0.0579

<sup>a,b</sup>Promedios con diferentes letras en la misma fila son significativamente diferentes (Prueba de Tukey-Kramer,  $P < 0.05$ ). <sup>1</sup>Recuento lineal de células somática. <sup>2</sup>Transformación logarítmica de unidades formadoras de colonias. <sup>3</sup>Temperatura real de la leche a través del tubo corto. <sup>4</sup>Temperatura infrarroja de la superficie del tubo corto de la unidad de ordeño.

Tabla 7. Correlaciones de las medias de parámetros evaluadores del grado de mastitis con las variables de temperatura real e infrarroja de las muestras con patógenos

	TrealM <sup>1</sup>		TIRM <sup>2</sup>		TrealT <sup>3</sup>		IRT <sup>4</sup>	
	r	Valor-P	r	Valor-P	r	Valor-P	r	Valor-P
RLCS <sup>5</sup>	0.71	0.0478	0.72	0.0423	0.19	0.6433	0.84	0.0086
LnUFC <sup>6</sup>	0.13	0.7492	0.46	0.2474	0.34	0.4097	0.68	0.0625

**Nota:** Los valores presentados son los coeficientes de correlación de Pearson (izquierda) y sus respectivos niveles de significancia (derecha),

<sup>1</sup>Temperatura real de la muestra de leche.

<sup>2</sup>Temperatura infrarroja de la muestra de leche; <sup>3</sup>Temperatura real de la leche a través del tubo corto; <sup>4</sup>Temperatura infrarroja de la superficie del tubo corto de la unidad de ordeño; <sup>5</sup>Recuento lineal de células somáticas; <sup>6</sup>Transformación logarítmica de unidades formadoras de colonias.

### Agradecimiento

Este material es basado en trabajo financiado por el National Institute of Food and Agriculture,

U.S. Department of Agriculture, bajo el número de otorgación 2011-36100-0609, proyecto AH-02.

### Literatura Citada

Barkema, H. W., Y. H. Schukken, T. J. G. M. Lam, M. L. Beiboer, H. Wilmsink, G. Benedictus, and A. Brand. 1998. Incidence of clinical mastitis in dairy herds grouped in three categories by bulk milk somatic cell counts. *J. Dairy Sci.* 81(2):411-19.

Berry, R. J., A. D. Kennedy, S. L. Scott, B. L. Kyle, and A. L. Schaefer. 2003. Daily variation in the udder surface temperature of dairy cows measured by infrared thermography: potential for mastitis detection. *Can. J. Anim. Sci.* 83(4):687-93.

Bradley, A. J. 2002. Bovine mastitis: An evolving disease. *Vet. J.* 164(2):116-28.

Colak, A., B. Polat, Z. Okumus, M. Kaya, L. E. Yanmaz, and A. Hayirli. 2008. Short communication: Early detection of mastitis using infrared thermography in dairy cows. *J. Dairy Sci.* 91(11):4244-48.

Curbelo-Rodríguez, J. E. 2011. Biophotonic imaging as a novel approach to study infectious diseases in the bovine. ProQuest, UMI Dissertation Publishing.

de Haas, Y., H. W. Barkema, and R. F. Veerkamp. 2002. The effect of pathogen-specific clinical mastitis on the lactation curve for somatic cell count. *J. Dairy Sci.* 85(5):1314-23.

de Haas, Y., R. F. Veerkamp, H. W. Barkema, Y. T. Gröhn, and Y.H. Schukken. 2004. Associations between pathogen-specific cases of clinical mastitis and somatic cell count patterns. *J. Dairy Sci.* 87(1): 95-105.

Dohoo, I. R., and A. H. Meek. 1982. Somatic cell counts in bovine milk. *Can. J. Anim. Sci.* 23(4):119-25.

García-Barreno P. 2008. Inflamación. *RACSAM.* 102(1):91-159.

Geary, U., N. Lopez-Villalobos, N. Begley, F. McCoy, B. O'Brien, L. O'Grady, and L. Shalloo. 2012. Estimating the effect of mastitis on the profitability of Irish dairy farms. *J. Dairy Sci.* 95(7):3662-73.

Hand, K. J., A. Godkin, and D. F. Kelton. 2012. Milk production and somatic cell counts: A Cow-level analysis. *J. Dairy Sci.* 95(3):1358-62.

Harmon, R. J. 1994. Physiology of mastitis and factors affecting somatic cell counts. *J. Dairy Sci.* 77(7):2103-12.

Hinrichs, D., E. Stamer, W. Junge, and E. Kalm. 2005. Genetic analyses of mastitis data using animal threshold models and genetic correlation with production traits. *J. Dairy Sci.* 88(6):2260-68.

Hovinen, M., J. Siivonen, S. Taponen, L. Hänninen, M. Pastell, A.-M. Aisla, and S. Pyörälä. 2008. Detection of clinical mastitis with the help of a thermal camera. *J. Dairy Sci.* 91(12):4592-98.

Igono, M. O., B. J. Steevens, M. D. Shanklin, and H. D. Johnson. 1985. Spray cooling effects on milk production, milk, and



- rectal temperatures of cows during a moderate temperate summer season. *J. Dairy Sci.* 68(4):979-85.
- Montero González, Teresita, José Hurtado de Mendoza Amat, and Pablo Cabrera Rosell. 2001. Daño múltiple de órganos: Morfología de la respuesta inflamatoria sistémica; Multiple organ failure. Morphology of systemic inflammatory response. *Rev. Cuba. Med. Mil.* 30(Supl.):77-88.
- Plastridge, W. N. 1958. Bovine mastitis: A Review. *J. Dairy Sci.* 41(9):1141-81.
- Polat, B., A. Colak, M. Cengiz, L. E. Yanmaz, H. Oral, A. Bastan, S. Kaya, and A. Hayirli. 2010. Sensitivity and specificity of infrared thermography in detection of subclinical mastitis in dairy cows. *J. Dairy Sci.* 93(8):3525-32.
- SAS 9.3. 2010. SAS 9.3 (Version 6.1.7607). Cary, NC, USA: SAS Institute, Inc.
- Wellnitz, O., E. T. Arnold and R. M. Bruckmaier. 2011. Lipopolysaccharide and lipoteichoic acid induce different immune responses in the bovine mammary gland. *J Dairy Sci.* 94(11):5405-12.
- West, J. W., G. M. Hill, J. M. Fernandez, P. Mandebvu, and B. G. Mullinix. 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(11):2455-65.
- West, J. W., B. G. Mullinix, and J. K. Bernard. 2003. Effects of hot, humid weather on milk temperature, dry matter intake, and milk yield of lactating dairy cows. *J. Dairy Sci.* 86(1):232-42.
- Wilson, David J., Ruben N. Gonzalez, and Helena H. Das. 1997. Bovine mastitis pathogens in New York and Pennsylvania: Prevalence and effects on somatic cell count and milk production. *J. Dairy Sci.* 80(10):2592-98.