



UNIVERSITAT
POLITÈCNICA
DE VALÈNCIA

MÁSTER EN PRODUCCIÓN ANIMAL

**Evaluación de la espectroscopia de infrarrojo medio
para estimar el recuento de células somáticas en
muestras de control lechero de ganado caprino**

Trabajo Fin de Máster

Valencia, Septiembre 2018

Mónica Muñoz Piedrahita

Director
Cristòfol Peris i Ribera

AGRADECIMIENTOS

Primero quiero agradecer a mi familia, por todo el apoyo y el esfuerzo que han puesto para que yo pudiera disfrutar de esta nueva experiencia en el extranjero, a mis padres, mi hermana y mi cuñado.

Segundo a mi Director de Tesis, Cristòfol Peris Ribera, por ser un guía importante en mi proceso de investigación y por su gran labor como educador.

Tercero al personal del LICOVAL por su amable colaboración en el análisis de muestras.

Cuarto a la profesora Pilar Hernández que nos facilitó equipos y el programa de análisis de datos.

¡Gracias a todos!

LISTA DE ABREVIATURAS

CS: Células somáticas

D.E.: Desviación Estándar

I₀: Intensidad de luz antes

I: Intensidad de luz después

IMI: Infecciones Intra- Mamarias

IR: Infrarrojo

FTIR: Espectroscopia de transmisión de infrarrojo con transformada de Fourier

Max: Máximo

Min: Mínimo

MIRS: Región Espectral del Infrarrojo Medio

OAS: Modelo Oscilador Armónico Simple

PLS: Mínimos Cuadrados Parciales

r²: Coeficiente de determinación

RCS: Recuento de Células Somáticas

rpm: Revoluciones por minuto

SEC: Error Estándar de Calibración

SECV: Error estándar de validación cruzada

SEP: Error de Predicción

1-VR: Varianza explicada

RESUMEN

Se ha estudiado la espectroscopia de infrarrojo medio (MIR) para estimar el recuento de células somáticas (RCS) en las muestras del control lechero del ganado caprino (raza Murciano-Granadina). Las ecuaciones de regresión se llevaron a cabo con el método PLS utilizando el programa WinISI 4. En un primer experimento se utilizaron tres grupos de muestras para llevar a cabo tres calibraciones. En todas las muestras se dispuso del espectro MIR y del RCS por citometría de flujo. El grupo 1 estaba formado por 598 muestras procedentes de 23 granjas, que fueron analizadas en diferentes días, a lo largo de un periodo de 5 meses, y con alta variabilidad en el RCS, grasa y proteína. El grupo 2 (n= 387) correspondió a muestras analizadas en el mismo día, y pertenecían a una misma granja. El grupo 3 (n=295) también fueron muestras analizadas en un mismo día, procedentes de una granja diferente a la del grupo 2. Se consideró como mejor calibración aquella que presentó un menor Error Estándar de Validación Cruzada (SECV). Las tres ecuaciones obtenidas (calibraciones 1,2 y 3 para los grupos 1,2 y 3, respectivamente) presentaron un Error estándar Calibración (SEC) de 2457×10^3 , 846×10^3 y 1399×10^3 cels/ml, respectivamente, un Coeficiente de Determinación (R^2) de 0,64, 0,427 y 0,437, un SECV de 2583×10^3 , 934×10^3 y 1509×10^3 cels/ml y una Varianza explicada (1-VR) de 0,61, 0,30 y 0,28. La validación se realizó con la calibración 1, ya que tenía un mayor R^2 y varianza explicada del RCS, utilizando 228 muestras externas. El Error Estándar de la validación (SEP) fue de 1728×10^3 céls/ml y el R^2 de 0,44.

Dado que en el experimento 1 no se obtuvieron buenos resultados predictivos, se planteó un segundo experimento, con el objetivo de identificar zonas del espectro relacionadas con el aumento del RCS. Para ello se utilizaron 5 muestras con bajos RCS, a las que se añadieron un concentrado de células somáticas, para crear 5 niveles de concentraciones crecientes de RCS. A todas las muestras se registró el espectro MIR y el RCS mediante citometría de flujo. Tras la representación de los espectros no se pudo identificar ninguna región que, de forma sistemática, presentara un patrón consistente de variación en las absorbancias al aumentar el nivel de células somáticas. Se concluye que la espectroscopia MIR es un método

con una insuficiente capacidad de predicción del RCS en las muestras de control lechero del ganado caprino.

RESUM

S'ha estudiat l'espectroscòpia d'infraroig mitjà (MIR) per estimar el recompte de cèl·lules somàtiques (RCS) en les mostres del control lleter del bestiar caprí (raça Murciano-Granadina). Les equacions de regressió es van dur a terme amb el mètode PLS utilitzant el programa WinISI 4. En un primer experiment es van utilitzar tres grups de mostres per dur a terme tres calibratges. En totes les mostres es va disposar de l'espectre MIR i del RCS per citometria de flux. El grup 1 estava format per 598 mostres procedents de 23 granges, que van ser analitzades en diferents dies, al llarg d'un període de 5 mesos, i amb alta variabilitat en el RCS, greix i proteïna. El grup 2 (n = 387) va correspondre a mostres analitzades en el mateix dia, i pertanyien a una mateixa granja. El grup 3 (n = 295) també van ser mostres analitzades en un mateix dia, procedents d'una granja diferent a la del grup 2. Es va considerar com a millor calibratge aquella que va presentar un menor Error Estàndard de Validació Creuada (SECV). Les tres equacions obtingudes (calibratges 1,2 i 3 per als grups 1,2 i 3, respectivament) van presentar un Error estàndard Calibratge (SEC) de 2457×10^3 , 846×10^3 i 1399×10^3 cels / ml, respectivament, un coeficient de determinació (R^2) de 0,64, 0,427 i 0,437, 1 SECV de 2583×10^3 , 934×10^3 i 1509×10^3 cels / ml i una variància explicada (1-VR) de 0,61, 0,30 i 0,28. La validació es va realitzar amb el calibratge 1, ja que tenia un major R^2 i variància explicada del RCS, utilitzant 228 mostres externes. L'Error Estàndard de la validació (SEP) va ser de 1728×10^3 Cels / ml i el R^2 de 0,44.

Atès que en l'experiment 1 no van obtenir bons resultats predictius, es va plantejar un segon experiment, amb l'objectiu d'identificar zones de l'espectre relacionades amb l'augment del RCS. Per a això es van utilitzar 5 mostres amb baixos RCS, a les quals es van afegir un concentrat de cèl·lules somàtiques, per crear 5 nivells de concentracions creixents de RCS. A totes les mostres es va registrar l'espectre MIR i el RCS mitjançant citometria de flux. Després de la representació dels espectres no es va poder identificar cap regió que, de forma sistemàtica, presentés un patró consistent de variació en les absorbàncies en augmentar el nivell de cèl·lules somàtiques. Es conclou que l'espectroscòpia MIR és un mètode amb una insuficient capacitat de predicció del RCS en les mostres de control lleter del bestiar caprí.

SUMMARY

Medium infrared spectroscopy (MIR) has been studied to estimate the somatic cell count (SCR) in the milk control samples of goats (Murciano-Granadina breed). The regression equations were carried out with the PLS method using the WinISI 4 program. In a first experiment, three groups of samples were used to carry out three calibrations. In all the samples, the MIR spectrum and the RCS were available by flow cytometry. Group 1 consisted of 598 samples from 23 farms, which were analyzed on different days, over a period of 5 months, and with high variability in SCR, fat and protein. Group 2 (n = 387) corresponded to samples analyzed on the same day, and belonged to the same farm. Group 3 (n = 295) were also samples analyzed on the same day, from a different farm to that of group 2. The one with the lowest Standard Cross-Validation Error (SECV) was considered the best calibration. The three obtained equations (calibrations 1,2 and 3 for groups 1,2 and 3, respectively) presented a Standard Error Calibration (SEC) of 2457×10^3 , 846×10^3 and 1399×10^3 cels / ml, respectively, a Coefficient of Determination (R²) of 0.64, 0.427 and 0.437, a SECV of 2583×10^3 , 934×10^3 and 1509×10^3 cels / ml and an Explained Variance (1-VR) of 0.61, 0.30 and 0.28. Validation was performed with calibration 1, since it had a higher R² and explained variance of RCS, using 228 external samples. The Validation Standard Error (SEP) was 1728×10^3 cels / ml and R² was 0.44.

Given that good predictive results were not obtained in experiment 1, a second experiment was proposed, with the objective of identifying areas of the spectrum related to the increase in SCR. To do this, 5 samples with low RCS were used, to which a concentration of somatic cells was added, to create 5 levels of increasing concentrations of SCR. The MIR spectrum and the RCS were recorded by means of flow cytometry to all the samples. After the representation of the spectra, no region could be identified that, in a systematic way, presented a consistent pattern of variation in the absorbances when increasing the level of somatic cells. It is concluded that MIR spectroscopy is a method with insufficient predictive capacity of SCR in dairy control samples of goats.

INDICE

INDICE DE MATERIAS

1. INTRODUCCION	13
1.1 Producción lechera de cabra en el mundo.....	14
1.2 Control lechero en ganado caprino.....	15
1.3 Recuento de células somáticas y mamitis.....	16
1.4 Espectroscopia del infrarrojo medio (MIR).....	18
2. Justificación y objetivos	21
3. Materiales y métodos	23
3.1 Diseño experimental.....	24
3.2 Concentrado de células somáticas.....	27
3.3 Variables analizadas.....	28
3.4 Manejo de datos y proceso de calibración / validación.....	29
4. Resultados y discusión	31
5. Conclusiones	44
6. Bibliografía	46

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Características de las muestras de leche utilizadas para llevar a cabo las calibraciones (tres grupos de muestras) y la validación para estimar el RCS mediante espectroscopia del infrarrojo medio en muestras de control lechero de ganado caprino

Tabla 2. Resultados analíticos del RCS (célis/ml) en 5 muestras de leche con bajos recuentos (leche matriz) a las que se adicionó células somáticas para obtener 4 niveles crecientes de esta variable

Tabla 3. Características y estadísticos obtenidos en los procesos de regresión realizados para obtener las mejores calibraciones para estimar el RCS mediante espectroscopia del infrarrojo medio en tres grupos de muestras de control lechero de ganado caprino

Tabla 4. Clasificación de las muestras utilizadas en la validación del RCS estimado con la calibración 1 por clases cualitativas (bajo, medio-bajo, medio-alto y alto). Para cada una de estas clases, distribución porcentual según la clase del RCS de referencia

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Absorbancia (%A) vs longitud de onda (cm-1)

Figura 2. Resultados de la validación de la Calibración 1 obtenida para estimar el RCS mediante espectroscopia del infrarrojo medio en muestras de control lechero del ganado caprino (n=228)

Figura 3. Residuales (RCS ref – RCS calibración 1) obtenidos en la validación de la Calibración 1 para estimar el RCS mediante espectroscopia del infrarrojo medio en muestras de control lechero del ganado caprino (n=228)

Figura 4. Espectros de absorbancia entre los pines 240 a 399 en 5 muestras de leche de control lechero. En cada gráfica se ha registrado los espectros de 5 niveles crecientes de células somáticas (niveles 0 a 5).

Figura 5. Espectros de absorbancia entre los pines 400 a 599 en 5 muestras de leche de control lechero. En cada gráfica se ha registrado los espectros de 5 niveles crecientes de células somáticas (niveles 0 a 5).

Figura 6. Espectros de absorbancia entre los pines 600 a 799 en 5 muestras de leche de control lechero. En cada gráfica se ha registrado los espectros de 5 niveles crecientes de células somáticas (niveles 0 a 5).

Figura 7. Espectros de absorbancia entre los pines 900 a 1060 en 5 muestras de leche de control lechero. En cada gráfica se ha registrado los espectros de 5 niveles crecientes de células somáticas (niveles 0 a 5).

1. INTRODUCCION

1.1 La producción de leche de cabra

Durante siglos, la cabra ha sido uno de los mamíferos domésticos más importantes para el ser humano, ya que éste ha aprovechado su leche, carne y pieles. Desde un punto de vista nutricional la leche de cabra se caracteriza por poseer mayor concentración de Ca y Na que la leche de vaca y la leche humana. Además, en ocasiones es tolerada por algunos consumidores que tienen alergias o desordenes gastrointestinales por causa del consumo de leche de vaca (Haenlein, 2004; Bhattarai, 2012).

En el mundo podemos diferenciar dos grandes modelos de producción de leche de cabra. Por un lado, en los países en extrema pobreza y países en desarrollo de Asia, África y América se suelen utilizar razas con un bajo nivel productivo, pero bien adaptadas a las condiciones ambientales de cada zona. En estos países, la leche de cabra representa un sustento económico y alimenticio importante para la población. Su explotación es atractiva porque requiere de una baja inversión de capital, poca mano de obra, mínimas condiciones para su mantenimiento, como poca tierra, además de tener una buena adaptación a muchos tipos de ambientes (desde condiciones extremas de poco pastoreo o aridez, hasta zonas de montaña) y temperaturas (Bhattarai, 2012). Así mismo, las hembras de esta especie presentan un periodo de gestación corto y empiezan a producir leche siendo muy jóvenes (15-17 meses de edad).

Por otro lado, en los países desarrollados, principalmente en el área mediterránea europea, la producción de leche caprina se basa cada vez más en sistemas de explotación intensivos, utilizando razas con altos niveles productivos, puesto que están integradas en esquemas de mejora genética. La mayor parte de la leche no

se consume de forma directa sino que va destinada principalmente a la industria quesera para obtener productos de alta calidad y elevado valor añadido.

Entre los años 2000 y 2013 la producción mundial de leche de cabra aumentó un 41%, de modo que llegó a alcanzar los 18 millones de Tm (FAOSTAT). El 82% de esta producción se obtiene en 10 países o regiones, encabezados por la India (5 millones de toneladas; 27,8 % de la producción mundial), Bangladesh (2,62 millones de Tm; 14,6%) y la UE-28 (1,86 millones Tm; 10,4% de la producción mundial). En Europa, los principales países productores de leche de cabra son: Grecia (24% de la producción de la UE), España (23%), Francia (19%), Rumania (14%) e Italia (12%).

De acuerdo a INLAC (2015), en España se producen anualmente unos 418 millones de litros de leche de cabra, principalmente en las CC.AA. de Andalucía (178 millones de litros; 42%), Castilla – La Mancha (81 millones de litros; 19%), Murcia (57 millones de litros; 13%), Extremadura (33 millones de litros; 7%) y Canarias (20 millones de litros; 4%). En la Comunitat Valenciana existen unas 120 explotaciones de caprino lechero, mayoritariamente de la raza Murciano-Granadina, que producen anualmente unos 9,8 millones de litros de leche de cabra (INLAC, 2015).

1.2 Control lechero en ganado caprino

Uno de los pilares de los esquemas de mejora genética de la producción de leche es llevar a cabo un control lechero periódico en cada una de las explotaciones que participan del programa de mejora. Su fundamento es registrar en cada una de las cabras que están en lactación, cada 4 ó 6 semanas, la producción de leche, su composición (grasa, proteína y extracto seco) y el recuento de células somáticas

(RCS). La gestión del Control Lechero Oficial es autonómica y en la actualidad recae en un Centro Autonómico del Control Lechero nombrado por la Comunidad Autónoma (FEDASLLET en la Comunitat Valenciana). Los análisis de las muestras de leche tomadas en el control lechero se suelen realizar en los laboratorios interprofesionales lecheros (LICOVAL en la Comunitat Valenciana) utilizando equipos automáticos de espectroscopia del infrarrojo medio, para la determinación de la composición de la leche, y la citometría de flujo (método fluoro-opto-electrónico) para el análisis del RCS.

1.3 Recuento de células somáticas y mamitis

La mamitis es una enfermedad que existe en todas las explotaciones productoras de leche, puesto que no se puede erradicar. Los animales afectados disminuyen la producción y la calidad de la leche (composición, propiedades organolépticas o de conservación), además de que se compromete su bienestar animal.

La mamitis es una inflamación de la glándula mamaria que cambia la anatomía y fisiología de la ubre en respuesta a una infección por microorganismos o como respuesta a una lesión o enfermedad sistémica. La inflamación provoca un aumento en la transferencia de leucocitos de la sangre a la leche. Estas células inflamatorias, junto a las células epiteliales de descamación, reciben el nombre de células somáticas presentes en la leche.

La mastitis se presenta de dos formas: clínica y subclínica. La mamitis clínica (severa) presenta lesiones visibles en la ubre que pueden variar de acuerdo al curso que lleva la enfermedad, con formación de nódulos y cambios en la apariencia de la leche, que podría contener floculos, material porulento o tener aspecto descolorido. La mastitis subclínica es una inflamación que no se detecta clínicamente pero que afecta de manera adversa la producción. Suele persistir entre lactaciones y, sin embargo, pasa desapercibida para el ganadero ya que la única manifestación visible es el descenso de la producción láctea (generalmente

entre el 10-20%). Este tipo de mastitis son las que producen mayores pérdidas económicas puesto que se presenta con mayor frecuencia que la forma clínica, es de difícil detección y afecta la calidad y producción de la leche (García y Vázquez, 2012).

El RCS de la leche también se ve afectado por factores de naturaleza no infecciosa, entre los cuales podemos destacar las siguientes:

1. El estado de lactación. A lo largo de la lactación el RCS sigue una curva inversa a la de la producción de leche, de modo que los recuentos son más elevados tras el parto y al final de la lactación (Sharma et al., 2011). Durante la lactancia temprana y tardía, el porcentaje de neutrófilos tiende a aumentar mientras que el porcentaje de linfocitos disminuye (McDonald & Anderson, 1981).
2. Edad o número de lactación. En ganado vacuno el RCS apenas aumenta con la edad, cuando solo se consideran las glándulas no infectadas (Harmon, 1994). Por el contrario, en las cabras libres de infección intramamaria si que se observan incrementos importantes del RCS a medida que las cabras aumentan de edad (Raynal-Ljutovac et al, 2007).
3. Celo. En ganado caprino se ha demostrado que la presencia del celo provoca fuertes elevaciones transitorias del RCS, tanto en los animales sanos como en los afectados de mamitis subclínica (Mehdid et al., 2013).

Existen dos métodos de diagnóstico para detectar las glándulas afectadas de infecciones intramamarias. El diagnóstico directo se fundamenta en identificar la presencia de gérmenes patógenos procedentes del interior de la ubre, bien mediante un análisis bacteriológico clásico (Harmon et al., 1990) o bien mediante PCR. El diagnóstico indirecto se basa en definir umbrales de algunos biomarcadores presentes en la leche (u otras características de la leche o de la ubre, como por ejemplo la conductividad eléctrica de la leche) que permitan

separar a las glándulas sanas de las infectadas. En este sentido, el RCS es el principal biomarcador de la leche utilizado para el diagnóstico de los animales afectados de mastitis (Hogeveen, 2005; Sharma et al., 2011). Sin embargo, en las cabras la detección de mastitis solo por medio del RCS es compleja, debido a la gran influencia que tienen algunos factores no infecciosos sobre el RCS (Leitner et al., 2007).

1.4 Espectroscopia del infrarrojo medio (MIR)

La espectroscopia puede definirse como el estudio de la interacción de una onda electromagnética con la materia. La radiación electromagnética comprende varias regiones según las longitudes de onda que abarcan: la región de rayos X (0,5-10nm), ultravioleta (10-350 nm), visible (350-800 nm), infrarrojo cercano (800-2500 nm), infrarrojo medio (2500-25000 nm), microondas (100 μ m-1 cm) y radio frecuencia (1 cm-1m).

La espectroscopia del infrarrojo medio se está utilizando masivamente para el registro de datos de la composición de la leche. En la región del infrarrojo medio, cuando la materia es atravesada por la radiación electromagnética los enlaces de las moléculas (ej. C-H, O-H, N-H) realizan movimientos (ej. vibración o rotación) que conllevan una mayor o menor absorción de la energía proporcionada. A partir de la energía suministrada y la cantidad de energía absorbida por la muestra irradiada, y utilizando pretratamientos matemáticos de los espectros, es posible determinar en muestras su composición química y los componentes correlacionados (Givens y Deaville, 1999; De Marchi et al. 2014).

Se utiliza un interferómetro para generar un haz de luz que contiene simultáneamente diferentes combinaciones de las longitudes de onda de la región del MIR. Posteriormente se utiliza el algoritmo denominado Transformada de Fourier para generar la totalidad del espectro, es decir, las absorbancias o

transmitancias en cada una de las longitudes de onda de la radiación electromagnética utilizada. El conjunto del espectro constituirá la huella dactilar del compuesto o sustancia analizada (Piqué y Vázquez, 2012).

Por ejemplo, en la Figura 1 se ha representado un espectro registrado con MIR, presentando en ordenadas (eje y) la absorbancia y en abscisas (eje x) la longitud de onda ($400\text{-}4000\text{ cm}^{-1}$ / $2.500\text{-}25.000\text{ nm}$; Silva, 2006).

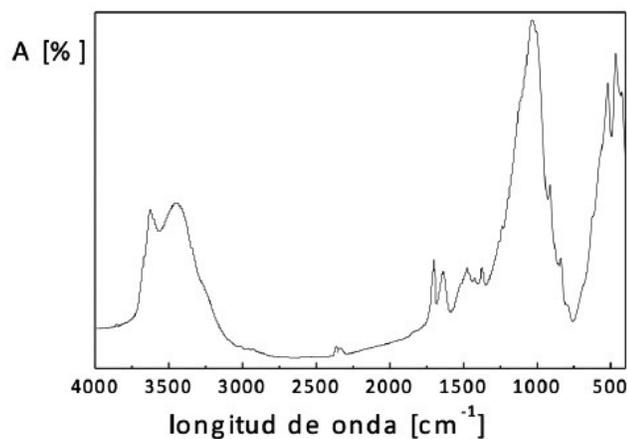


Figura 1. Absorbancia (%A) vs longitud de onda (cm^{-1})

La espectroscopia MIR permite analizar una gran cantidad de muestras en corto tiempo y a bajo coste analítico (Dal Zotto et al., 2008). Tradicionalmente se ha utilizado para medir los principales componentes de la leche (grasa, proteína, lactosa, materia seca), pero en los últimos años han aparecido calibraciones para determinar nuevos componentes (De Marchi, 2014; Gengler et al., 2016; Bastin et al., 2016) relacionados con la calidad de la leche (ácidos grasos, fracciones proteicas, urea, minerales, características tecnológicas.) o biomarcadores

relacionados con el bienestar animal o la detección de ciertos estados fisiológicos (desequilibrios nutricionales, gestación, metano).

No obstante, en la bibliografía existe muy poca información sobre la predicción del RCS en la leche a partir de la espectroscopia MIR. De hecho, tan solo disponemos de un trabajo (Marissal y Marinot, 2016), realizado en leche de cabra, si bien la calibración obtenida por estos autores no permite estimar con suficiente precisión el RCS en las muestras del control lechero del ganado caprino.

2. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

Las muestras del control lechero suelen analizarse en los laboratorios interprofesionales lecheros, donde se determina la composición (grasa, proteína, lactosa, materia seca y, en ocasiones, urea) mediante espectroscopia MIR y el RCS mediante citometría de flujo.

Sin embargo, podría ser interesante que en los citados laboratorios también pudiera estimarse el RCS mediante el mismo equipo MIR utilizado para el análisis de la composición de la leche. Si ello fuera posible, se abarataría sensiblemente el coste del análisis, puesto que se prescindiría del equipo que actualmente se utiliza para analizar el RCS.

Dada la escasa información bibliográfica que existe, se ha planteado el presente trabajo con el objetivo de realizar una primera evaluación de la espectroscopia MIR para estimar el RCS en las muestras del control lechero en ganado caprino.

3. MATERIAL Y METODOS

3.1 Diseño experimental

En este trabajo se presentan los resultados de dos experimentos. En el experimento 1 se llevó a cabo un proceso de calibración para estimar el RCS a partir de los espectros del infrarrojo medio de muestras de control lechero analizadas con un equipo automático para el análisis de leche.

El objetivo del experimento 2 fue observar si en los espectros existían zonas (longitudes de onda o pin) que se pudieran relacionar claramente con la concentración de RCS en la leche.

Experimento 1

Las muestras para llevar a cabo la calibración se eligieron a partir de dos bases de datos, que recogían los espectros (base de datos 1) y los resultados analíticos (base de datos 2) de 8125 muestras de control lechero de ganado caprino de raza Murciano-Granadina de 12 granjas de la Comunitat Valenciana, que fueron tomadas entre febrero y julio de 2018. Estas bases de datos fueron proporcionadas por el laboratorio LICOVAL del Institut de Ciència i Tecnologia Animal de la Universitat Politècnica de València. En la base de datos 1 se disponía de los espectros MIR de cada muestra. En la base de datos 2 estaban los resultados analíticos de la composición (grasa, proteína, lactosa y materia seca) y RCS de cada una de las muestras.

El procedimiento de calibración se llevó a cabo en tres grupos de muestras, realizándose tres calibraciones. El grupo 1 estaba constituido por un total de 598 muestras, que fueron elegidas de la base datos considerando que hubiera variabilidad en:

- 1) El contenido en RCS, grasa y proteína. Para ello las 8125 muestras disponibles se clasificaron en función del RCS (9 clases: <100, 101-250, 251-500, 501-750, 751-1000, 1001-2000, 2001-4000, 4001-8000, >8001 x10³ céls/ml), grasa (8 clases: <3, 3-4, 4-5, 5-6, 6-7, 7-8, >9 %p/p) y proteína (4 clases (<3, 3-4, 4-5, >5 %p/p). Se intentó que hubiera representación de todas las clases, con un máximo de 4 ó 5 muestras de cada combinación de clase RCS/grasa/proteína.
- 2) Las granjas origen de las muestras.
- 3) Las fechas de recogida de las muestras.

El grupo 2 correspondía a muestras que habían sido analizadas en el laboratorio en un mismo día (387 muestras, todas procedentes de la misma granja). El mismo criterio se utilizó para las muestras del grupo 3 (295 muestras analizadas en un día distinto, procedente de una granja distinta a las del grupo 2). Se plantearon estos dos grupos de muestras con objeto de estudiar si era posible mejorar la precisión de la calibración al utilizar muestras analizadas en un mismo día (por ejemplo, para evitar una posible deriva en el equipo).

Para llevar a cabo la validación de las calibraciones, se utilizaron todas las muestras de control lechero caprino analizadas en dos días distintos (total 228 muestras). Estas muestras no habían sido utilizadas en el proceso de calibración.

Las características de las muestras utilizadas en las 3 calibraciones realizadas (grupos 1,2 y 3) y en la validación se han recogido en la Tabla 1.

Experimento 2

Se llevó a cabo un primer control del RCS en muestras de leche del ordeño (50 ml) de 51 cabras de raza Murciano-Granadina de la granja de la Universitat Politècnica de València. Todas las cabras se encontraban en el 7±1 mes de lactación. A continuación se eligieron 5 cabras que presentaban un bajo RCS en la

leche ($< 300 \times 10^3$ cels/ml) y 5 cabras con altos RCS (entre 4.000×10^3 y 16.500×10^3 céls/ml). En el ordeño del día siguiente se tomó una muestra de 1 litro de

Tabla 1. Características de las muestras de leche utilizadas para llevar a cabo las calibraciones (tres grupos de muestras) y la validación para estimar el RCS mediante espectroscopia del infrarrojo medio en muestras de control lechero de ganado caprino

Variable	Muestras calibración			Muestras validación	
	Grupo 1	Grupo 2	Grupo3	Grupo validación	
n	598	387	295	228	
Media	2437	743	1460	1483	
RCS (céls/ml)	Des.Est.	4095	1115	1857	2200
Minimo	51	20	68	44	
Máximo	27855	13824	14543	14508	
Media	6,16	4,59	6,93	4,54	
Grasa (%p/p)	Des.Est.	1,86	0,68	1,10	0,79
Minimo	2,11	2,63	4,60	2,14	
Máximo	9,89	6,43	12,98	7,44	
Media	3,79	3,45	3,72	3,50	
Proteína (%p/p)	Des.Est.	0,72	0,40	0,33	0,39
Minimo	2,44	2,44	2,72	2,38	
Máximo	7,22	5,04	5,14	5,01	
Media	4,69	4,76	4,76	4,71	
Lactosa (%p/p)	Des.Est.	0,28	0,19	0,18	0,20
Minimo	2,58	4,12	3,85	3,78	
Máximo	5,34	5,41	5,19	5,10	

leche de cada uno de los animales elegidos (total 10 muestras de 1 litro de leche), analizándose nuevamente el RCS para verificar los resultados del día anterior.

A partir de cada muestra de leche con bajos recuentos se constituyeron 5 muestras de 20 ml cada una con una concentración de RCS creciente. Para lograrlo se añadieron cantidades crecientes de un concentrado de células somáticas, obtenido de la leche de una sola cabra que presentaba elevados recuentos. De

este modo se crearon un total de 25 muestras de leche (5 muestras con bajos recuentos x 5 concentraciones de RCS), tal y como se ha descrito en la Tabla 2. A cada una de estas muestras se le registró su espectro MIR y se analizó el RCS, en ambos casos por duplicado.

Tabla 2. Resultados analíticos del RCS (céls/ml) en 5 muestras de leche con bajos recuentos (leche matriz) a las que se adicionó células somáticas para obtener 4 niveles crecientes de esta variable

Identif. de la cabra			Nivel de RCS ¹				
Concentrado de RCS (alto RCS)	Leche matriz (bajo RCS)	Muestra	0	1	2	3	4
O2	332	1	31	482	1278	2586	5765
Y4	B7	2	76	720	2159	4023	6706
Y1	348	3	154	2716	8370	16150	21845
Y8	337	4	254	1492	4488	9043	12990
G3	B0	5	96	714	1918	4039	6178

¹ Los 5 niveles de RCS se obtuvieron del siguiente modo:

0: 20 ml de leche de cabra matriz sin concentrado de RCS

1: 8 ml de muestra de nivel 0 + 2 ml de concentrado RCS + 10 ml de leche matriz. Total 20 ml

2: 8 ml de muestra de nivel 1 + 3 ml de concentrado RCS + 9 ml de leche matriz. Total 20 ml

3: 8 ml de muestra de nivel 2 + 6 ml de concentrado RCS + 6 ml de leche matriz. Total 20 ml

4: 8 ml de muestra de nivel 3 + 9 ml de concentrado RCS + 3 ml de leche matriz. Total 20 ml

3.2 Concentrado de células somáticas

Para obtener los concentrados de células somáticas utilizados en el experimento 2 se siguió el procedimiento descrito por Amine (2009) y Bulaaba et al. (2011). Este

procedimiento se llevó a cabo, de forma separada, para cada una de las 5 muestras de leche con altos recuentos (Tabla 2). De cada muestra se tomaron 6 alícuotas de 35 ml que fueron sometidas a centrifugación, en tubos cónicos de policarbonato, a 2586 rpm (800 x g) durante 15 minutos a 4^oC. A continuación, la grasa era retirada con una espátula de la parte superior del tubo, y se volvió a repetir la centrifugación aplicada anteriormente. Después se volvía a retirar con la espátula la pequeña capa de grasa que aún permanecía en la parte superior del tubo y se retiraba la fase acuosa con una micropipeta. Esta última operación se realizaba con mucho cuidado para no resuspender el pellet de células somáticas que estaba adherido en el fondo del tubo. El siguiente paso era la resuspensión del pellet en unos 3,5 ml de la leche matriz (ver Tabla 2). Finalmente, se juntaron y se homogenizaron con un vortex los 6 concentrados de células somáticas (6 tubos) obteniéndose así 21 ml de concentrado procedente de una sola muestra de leche con altos recuentos.

3.3 Variables analizadas

Todos los análisis de la composición de la leche (grasa, proteína, lactosa y materia seca) y el registro de los espectros MIR fueron realizados en el equipo automático MilkoScan™ FT5000 (Foss-Electric S.A., Hillerod, Dinamarca). Este equipo registra las absorbancias en 1060 longitudes de onda (números de PIN de 240 a 1299) situadas en la banda del infrarrojo medio (longitudes de onda de 925-5010 cm⁻¹, cada 4 cm⁻¹).

El RCS de cada muestra fue obtenido por el método fluoro-óptico-electrónico (ISO/FIL, 2008) con el equipo automático Fossomatic™5000 (Foss-Electric S.A.). En este método las muestras se determinan mediante la tinción del ADN de la células con un colorante fluorescente y su recuento por citometría de flujo.

Los dos equipos, MilkoScan FT5000 y Fossomatic 5000, estaban unidos en línea (Combi Foss) de modo que las muestras era analizadas simultáneamente por ambos instrumentos.

Las muestras de leche del primer experimento fueron recogidas en las granjas comerciales por los controladores lecheros de la asociación AMURVAL. Estas muestras se recogían en tubos de polipropileno de 50 ml de capacidad, a las que se añadía el conservante azidiol (0,133 ml). Las muestras se mantenían en refrigeración (1-5°C) hasta su análisis, el cual normalmente se llevaba a cabo dentro de las 72 h tras su recogida.

Las muestras de leche del segundo experimento se recogieron del ordeño de cada cabra de la granja experimental del ICTA de la UPV. Estas muestras siempre se mantuvieron en refrigeración (1-5°C) antes de su procesado y análisis. La obtención del concentrado de células somáticas se llevó a cabo en las primeras 24 h tras la recogida de las muestras, mientras que el análisis de la composición, RCS y registro de los espectros se llevó a cabo 12-24 h después de la obtención de los concentrados.

Antes de su análisis, las muestras se atemperaban a temperatura ambiente y se invertían los frascos para asegurar la mezcla de su contenido. Además, el propio equipo Combifoss dispone de un sistema de agitación previo a la toma de la muestra para el análisis.

3.4 Manejo de los datos y proceso de calibración/validación

Los ficheros con los registros de los espectros (base de datos 1) y el RCS y la composición de la leche (base de datos 2) se exportaban del equipo de análisis en formato ASCII (ficheros CSV). Estos ficheros fueron importados al programa DBASE 5, en el cual se llevó a cabo la unión de los ficheros, la gestión de las muestras y la exportación de las muestras seleccionadas para la calibración (espectros y valores de referencia) en ficheros nuevamente en formato ASCII (fichero TXT).

El proceso de calibración se llevó a cabo con el programa WINISI IV. Para importar el fichero TXT, previamente se abría con Excel 2007 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

Para llevar a cabo la validación, la ecuación de calibración fue exportada a un fichero TXT y, a continuación, fue importada a Dbase 5. La ecuación se aplicó a las muestras de validación y los valores de RCS predichos por la ecuación y los de referencia fueron exportados al paquete estadístico SAS, donde se calculó una regresión lineal entre ambas variables mediante el PROC REG.

4. RESULTADOS Y DISCUSION

Experimento 1

En la Tabla 3 se han recogido las características de la calibración que presentó un menor SECV para predecir el RCS en las 598 muestras que conformaban el Grupo 1. (calibración 1) Puede observarse que los estadísticos obtenidos de esta calibración fueron deficientes, puesto que SEC y SECV fueron muy elevados (2457×10^3 y 2583×10^3 céls/ml, respectivamente), mientras que R^2 y la varianza explicada fueron bajos (0,65 y 0,61, respectivamente). Las muestras del Grupo 1 procedían de 34 días de análisis de laboratorio realizados en el periodo de febrero a junio de 2018. Una hipótesis que podría explicar los malos resultados obtenidos sería que durante este periodo se hubiera producida algún tipo de deriva en el equipo de análisis que afectara exclusivamente a zonas del espectro relacionadas con el RCS. Para contrastar esta hipótesis se llevaron a cabo las calibraciones 2 y 3, con los grupos de muestras 2 y 3, respectivamente. Todas las muestras del grupo 2 fueron analizadas en el laboratorio en el mismo día, y lo mismo ocurrió con las muestras del grupo 3. Sin embargo, estas dos calibraciones tuvieron un peor R^2 (0,427 y 0,437) y una menor varianza explicada (0,30 y 0,34) que la calibración 1 descrita más arriba. Esto sugiere que debería rechazarse la hipótesis formulada anteriormente, de modo que no es probable que los deficientes resultados de la Calibración 1 fueran debidos principalmente a la existencia de una deriva en el equipo de análisis. Las calibraciones 2 y 3 tuvieron menores SEC (846×10^3 y 1399×10^3 cels/ml) y SECV (934×10^3 y 1509 cels/ml) que la calibración 1, pero esto se puede explicar por la menor variabilidad del RCS en las muestras de los grupos 2 y 3 respecto a las del grupo 1 (Tabla 1).

El procedimiento de validación tan solo se realizó con la calibración 1, puesto que era la que presentaba una mayor R^2 y varianza del RCS explicada. En la Figura 2 se han representado las muestras de validación de acuerdo al RCS de referencia (eje y) y el RCS estimado a partir de la ecuación de calibración 1 (eje x), mientras

que en la Figura 3 se han recogido los residuales (RCS referencia – RCS calibración 1). La media y desviación estándar de los residuales fue de -500×10^3

Tabla 3. Características y estadísticos obtenidos en los procesos de regresión realizados para obtener las mejores calibraciones para estimar el RCS (cél/ml) mediante espectroscopia del infrarrojo medio en tres grupos de muestras de control lechero de ganado caprino

	Calibración 1 (muestras Grupo 1)	Calibración 2 (muestras Grupo 2)	Calibración 3 (muestras Grupo3)
Método regresión	PLS modif.	PLS modif.	PLS modif.
Nº máximo de términos	16	16	16
Nº términos (factores) utilizados	15	12	12
Nº grupos validación cruzada	6	6	6
Pin inicial	241 (929 cm^{-1})	241 (929 cm^{-1})	241 (929 cm^{-1})
Procedimiento Pin final	509 (1963 cm^{-1})	510 (1967 cm^{-1})	500 (1929 cm^{-1})
Regresión			
Número total de pin	245 ^a	256 ^b	128 ^c
Método dispersión/corrección espectro	SNV	NO	NO
Derivadas	NO	NO	NO
Estadísticos			
n	599	386	295
Error estándar. Calibración (SEC)	2457×10^3	846×10^3	1399×10^3
Coef. Determinación (R^2)	0,64	0,427	0,437
Error estándar. Valid. Cruzada (SECV)	2583×10^3	934×10^3	1509×10^3
Varianza explicada (1-VR)	0,61	0,30	0,34

^a Corresponde al intervalo del 241-414, cada pin y del 437-509, cada pin

^b Corresponde al intervalo del 241-438, cada pin y del 451-510, cada pin

^c Corresponde al intervalo del 241-438, cada 2 pin y del 451-500, cada 2pin

y 1728×10^3 células/ml, respectivamente, y el R^2 fue de 0,44. Al ajustar el RCS obtenido de la calibración 1 con la ecuación de la regresión lineal de la Figura 1

($24,95 + 0,735 \times \text{RCS calibración1}$), la desviación estándar de las diferencias con el RCS de referencia apenas varió (1650×10^3 céls/ml).

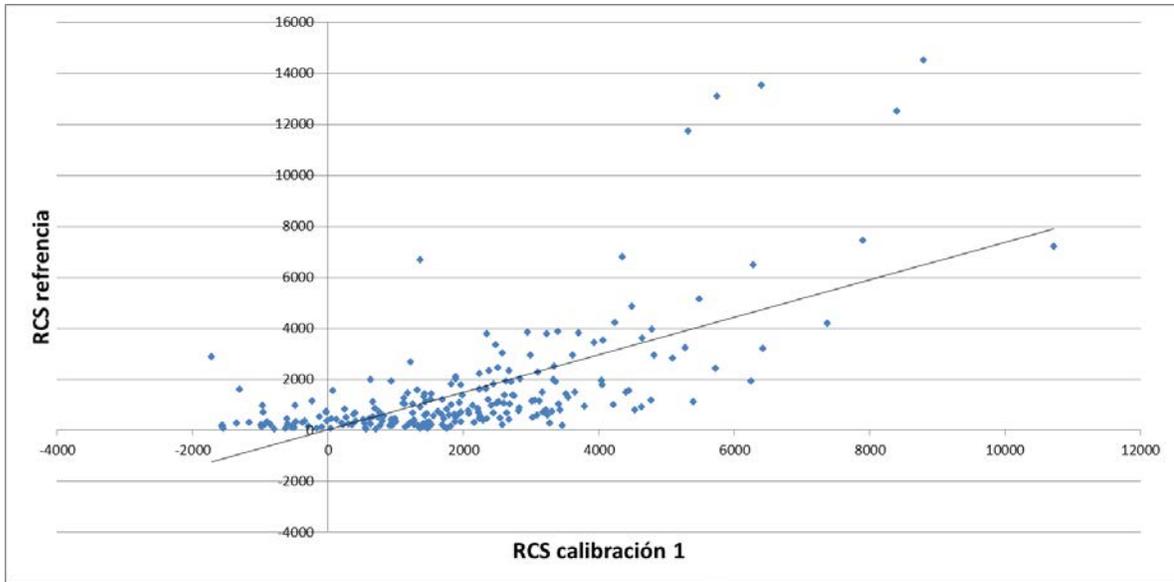


Figura 2. Resultados de la validación de la Calibración 1 obtenida para estimar el RCS mediante espectroscopia del infrarrojo medio en muestras de control lechero del ganado caprino (n=228)

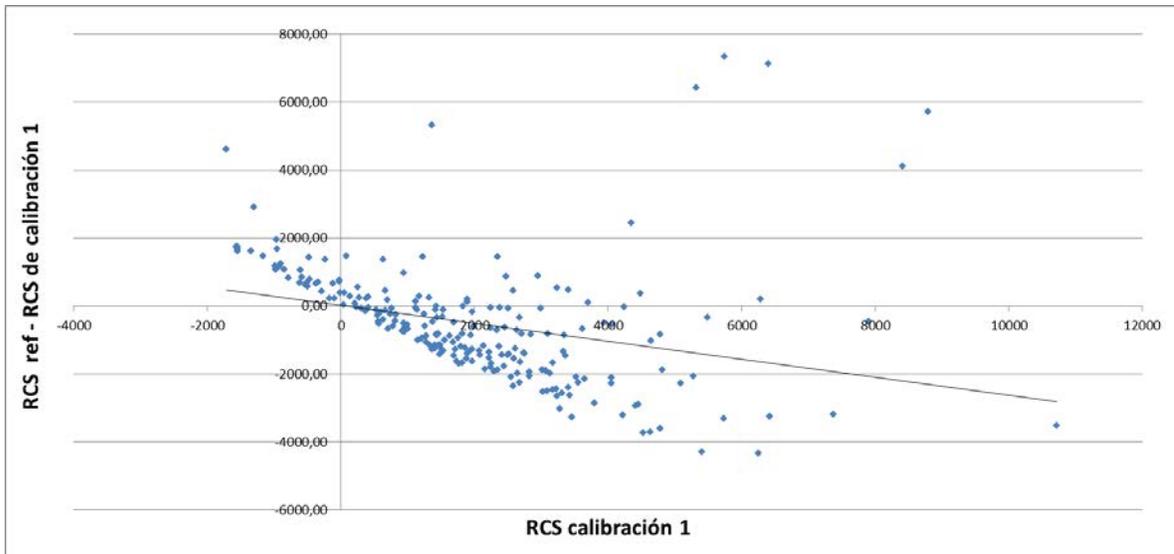


Figura 3. Residuales (RCS referencia – RCS calibración 1) obtenidos en la validación de la Calibración 1 para estimar el RCS mediante espectroscopia del infrarrojo medio en muestras de control lechero del ganado caprino (n=228)

Este elevado valor de desviación estándar (error estándar de la predicción) obtenido en la validación de la calibración 1 indicaría que ésta no posee suficiente precisión para realizar una predicción cuantitativa del RCS en las muestras de control lechero del ganado caprino.

Con objeto de evaluar la calibración 1 para llevar a cabo una predicción de carácter cualitativo del RCS, los valores predichos se clasificaron en 4 clases: bajo ($<1000 \times 10^3$), medio-bajo ($1000-2000 \times 10^3$), medio-alto ($2000-4000 \times 10^3$) y altos ($>4000 \times 10^3$). Una muestra se consideró que estaba correctamente clasificada cuando el RCS de referencia se encontraba dentro de los siguientes rangos: grupo bajo: $< 1100 \times 10^3$ céls/ml, grupo medio-bajo ($900-2100 \times 10^3$ cels/ml), grupo medio-alto ($1900-4100 \times 10^3$ cels/ml) y grupo alto ($> 3900 \times 10^3$ cels/ml). En la Tabla 4 se aprecia que la predicción del grupo bajo de RCS era bastante fiable, puesto que el 90% de las muestras clasificadas en este grupo estaban correctamente clasificadas. Por el contrario, las predicciones de los grupos medio-bajo, medio-alto y alto presentaron una muy baja fiabilidad (tan solo un 34,5, 31,9 y 45% de muestras correctamente clasificadas, respectivamente).

Experimento 2

Los espectros de absorbancia de los 5 niveles de células somáticas de cada una de las 5 muestras de leche utilizadas en el experimento 2 se han representado en la Figura 3 (pin 240-399), Figura 4 (pin 400-599), Figura 5 (pin 600-799) y Figura 6 (pin 900-1060). En general no se pudo identificar zonas del espectro en las que, de forma sistemática, es decir en las 5 muestras, se observara un patrón consistente de variación en las absorbancias al aumentar el nivel de células somáticas en una muestra de leche.

Tabla 4. Clasificación de las muestras utilizadas en la validación del RCS estimado con la calibración 1 por clases (bajo, medio-bajo, medio-alto y alto). Para cada una de estas clases, distribución porcentual según la clase del RCS de referencia

Clase RCS calib. 1 (n=228)	Clase RCS de referencia			
	Bajo	Medio bajo	Medio alto	alto
Bajo <1000x10 ³ cel/ml (n=70)	90	8,6	1,4	0
Medio bajo 1000-2000 x10 ³ cel/ml (n=58)	62	34,5	1,7	1,7
Medio alto 2000-4000 x10 ³ cel/ml (n=69)	40,5	27,5	31,9	0
Alto >4000 x10 ³ cel/ml (n=31)	6,45	25,8	22,6	45

En el espectro se aprecian zonas con una gran variabilidad de las absorbancias (pin 416 a 440 y 800 a 950), pero no son útiles para ser utilizadas en una calibración puesto que esta variabilidad, sin un patrón lógico y con mala repetibilidad, está provocada por las vibraciones de las moléculas del agua (Dagnachew et al., 2013). En el resto del espectro, se han identificado algunas zonas en las que, al menos en algunas muestras, se observó un aumento de variabilidad de las absorbancias a medida que aumentaba el nivel de células somáticas. Estas zonas se han marcado con un círculo rojo en las Figuras citadas anteriormente. Las longitudes de onda correspondientes a estas zonas marcadas, identificadas como pin, fueron utilizadas para llevar a cabo un nuevo proceso de calibración utilizando las muestras del grupo 1 del experimento 1. Sin embargo, la calibración obtenida presentó unos parámetros de ajuste (SEC=3250 x 10³ cels/ml; R²= 0,37; SECV= 3326 x 10²; varianza explicada = 1-VR= 0,34) peores a los obtenidos en la calibración 1 descrita en el experimento 1.

En la bibliografía tan solo se dispone de un trabajo que haya estudiado la utilización de la espectroscopia MIR para estimar el RCS en la leche de cabra

(Marinot y Marisal, 2016). La calibración obtenida en el citado trabajo también presentó unos pobres parámetros de precisión ($R^2= 0.51-0.52$ y $SEC/SEP= 2493 \times 10^3 / 2449 \times 10^3$ en la calibración y validación), siendo similares a las encontradas en nuestro estudio. Existe más información respecto a la utilización de la espectroscopia NIR para estimar el RCS en la leche y, en general, los resultados indican que es un poco más precisa. Así, Albanell et al. (2003) encuentran en la validación un $R^2 = 0,62$ en la leche de cabra, mientras que en leche de vaca Kawasaki et al. (2008) y Tsenkova y Atanassova (2001) encuentran en la validación una $R^2 = 0,68$ y $0,73$, respectivamente.

Por el momento, los resultados del presente trabajo sugieren que con la espectroscopia MIR no es posible llevar a cabo una determinación directa del RCS en la leche de cabra, puesto que no se han podido identificar zonas del espectro donde las absorbancias varíen de forma consistente al añadir células somáticas a una misma muestra. Por tanto, la estimación del RCS a partir de los espectros MIR sería una estimación indirecta a partir de los cambios en la composición de la leche, tal y como señalan Tsenkova et al (2001), para la leche de vaca, y Marinot y Marisal (2016), para la leche de cabra. En general, el incremento de células somáticas en la leche está asociado a la presencia de una infección intramamaria (mamitis), la cual también provoca cambios en la composición química de la leche ya que, por ejemplo, se produce una modificación en el perfil de ácidos grasos y de las proteínas (Ogola et al., 2007; Raynal-Ljutovac et al., 2007). Sin embargo, también existen factores no infecciosos que también influyen sobre el RCS, de entre los cuales podemos destacar al estado y número de lactación, el nivel productivo y, en el ganado caprino, la presencia del celo (Mehdid et al., 2013). Por tanto, cabe esperar que la relación del RCS con los cambios en la composición de la leche sea diferente según si el RCS aumenta por motivos infecciosos o no infecciosos. Esto sería aún más importante en la leche de cabra, puesto que en esta especie los factores no infecciosos influyen en mayor medida sobre el RCS que en el ganado vacuno y ovino (Mehdid, 2009).

Los aspectos descritos anteriormente podrían explicar los pobres resultados que se han obtenido, por el momento, con la espectroscopia MIR para estimar el RCS. Pero, al mismo tiempo, sugieren que podría mejorarse la precisión de la calibración si se consideraran algunos de los factores no infecciosos, como el número y estado de lactación y la producción de leche, puesto que esta información está disponible en las muestras de control lechero. Por ejemplo, sería interesante estudiar en un futuro calibraciones específicas para las cabras que estén en distinto número de lactación (primíparas, multíparas...) y estado de lactación (principio, mitad, final).

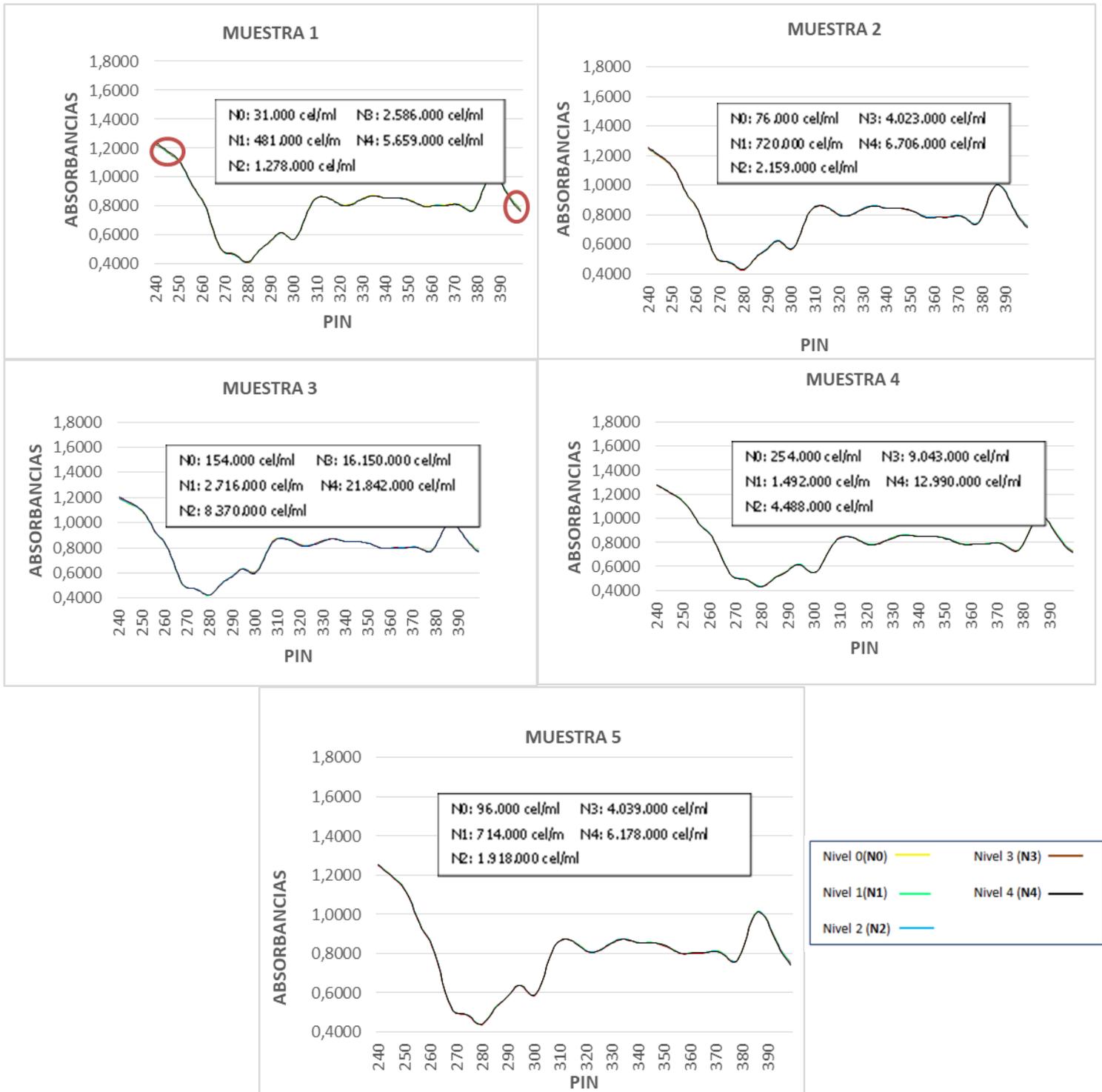


Figura 4. Espectros de absorbancia entre los pines 240 a 399 en 5 muestras de leche de control lechero. En cada gráfica se ha registrado los espectros de 5 niveles crecientes de células somáticas (niveles 0 a 4).

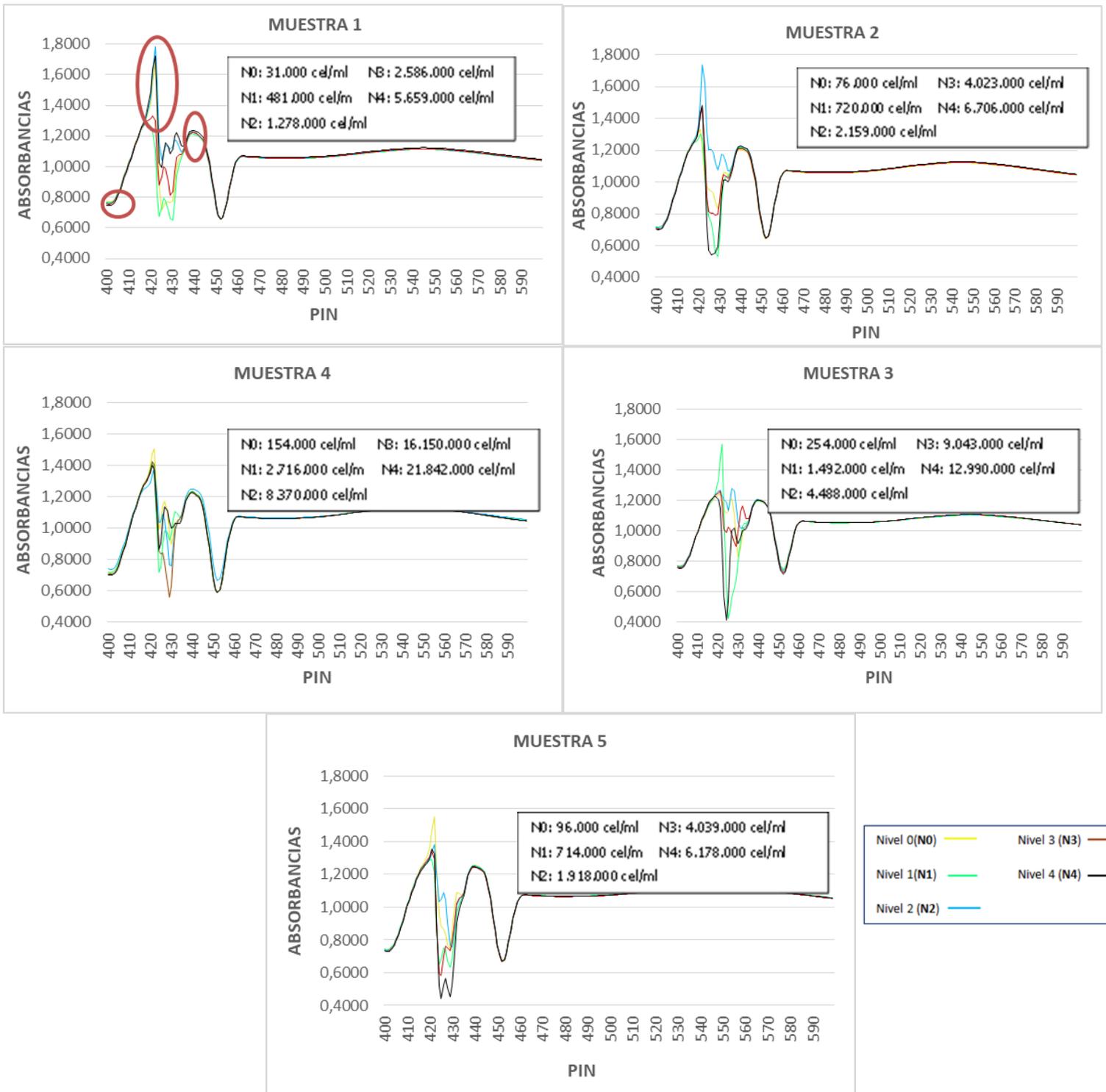


Figura 5. Espectros de absorbancia entre los pines 400 a 599 en 5 muestras de leche de control lechero. En cada gráfica se ha registrado los espectros de 5 niveles crecientes de células somáticas (niveles 0 a 4).

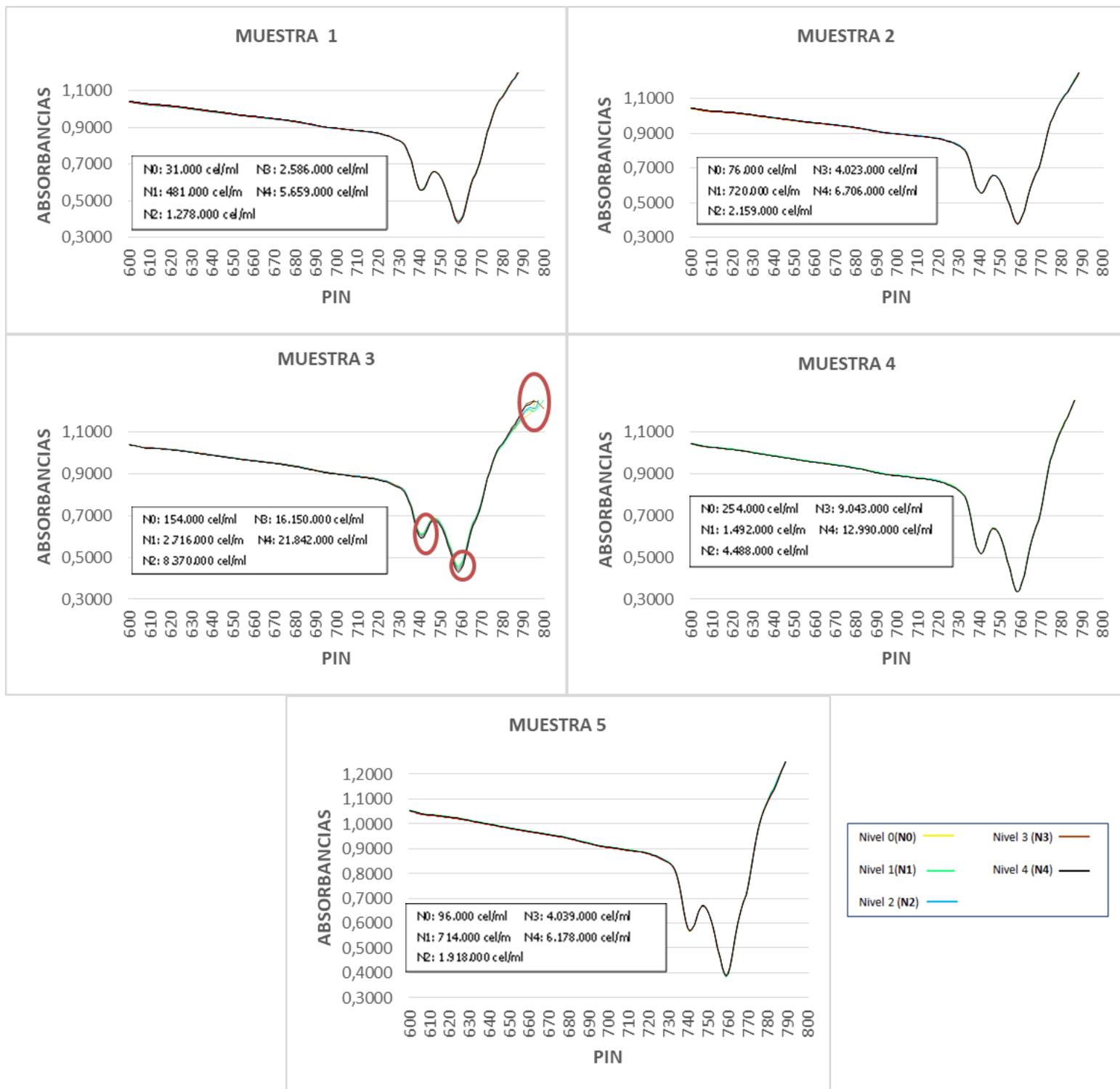


Figura 6. Espectros de absorbancia entre los pines 600 a 799 en 5 muestras de leche de control lechero. En cada gráfica se ha registrado los espectros de 5 niveles crecientes de células somáticas (niveles 0 a 4).

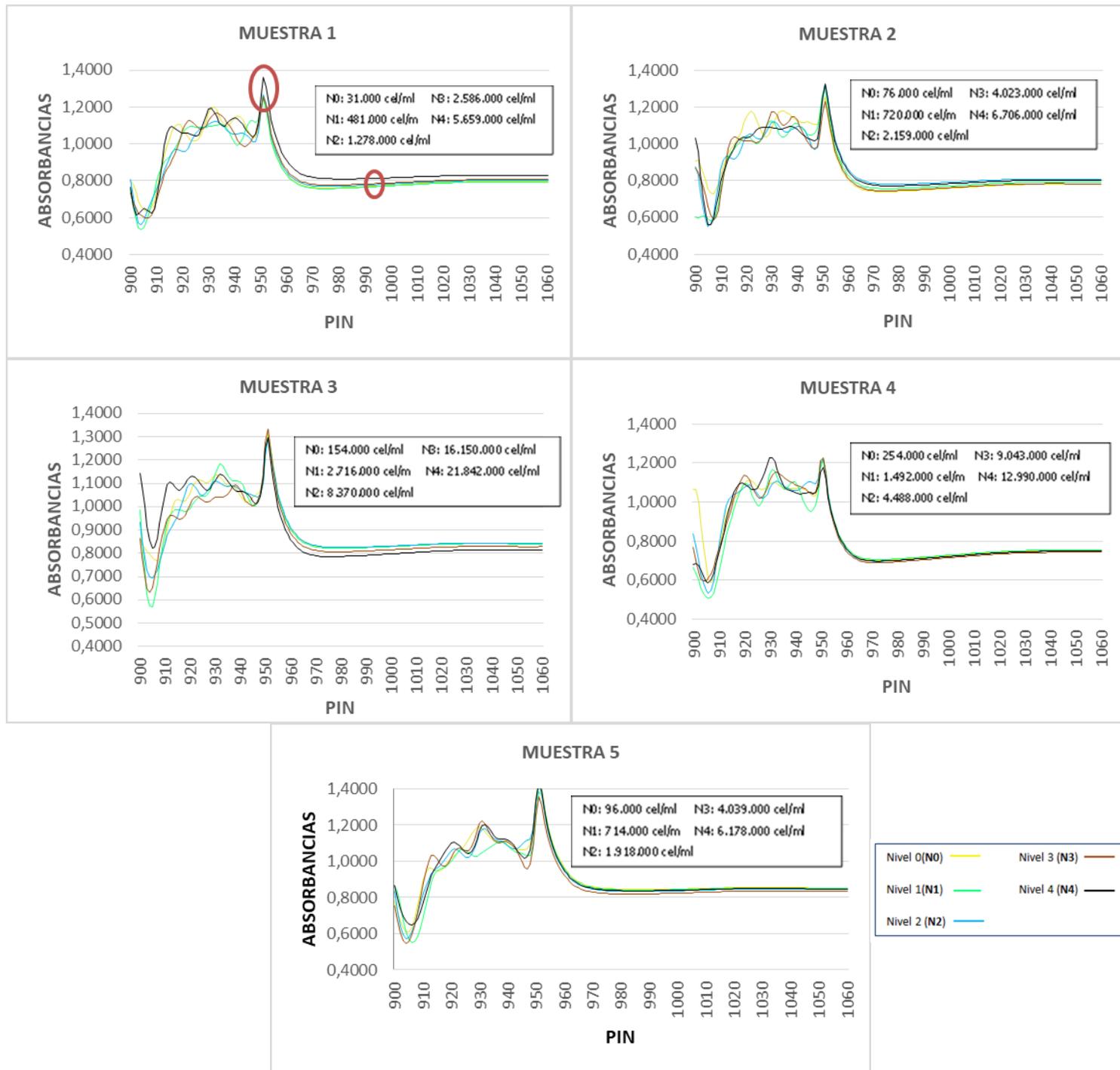


Figura 7. Espectros de absorbancia entre los pines 900 a 1060 en 5 muestras de leche de control lechero. En cada gráfica se ha registrado los espectros de 5 niveles crecientes de células somáticas (niveles 0 a 4).

5. CONCLUSIONES

En este trabajo se ha puesto de manifiesto que la estimación del RCS en las muestras del control lechero del ganado caprino mediante espectroscopia MIR es un proceso complejo. La mejor calibración que se ha encontrado presenta unos parámetros de predicción (calibración: $SEC = 2457 \times 10^3$ céls/ml , $R^2 = 0,64$; validación: $SEP = 1728 \times 10^3$ céls/ml, $R^2 = 0,44$) insuficientes para que pueda ser utilizada en el laboratorio, tanto para estimar la concentración de células somáticas en la leche, como para clasificar las muestras por clases de RCS (bajo, medio, alto).

Se debería estudiar, en un futuro, si la creación de calibraciones específicas para distintos estados y número de lactación de las cabras permitiría mejorar la precisión de la estimación del RCS con la espectroscopia MIR.

6. BIBLIOGRAFIA

- Albanell, E., Caja, G., Such, X., Rovai, M., Salama, A. A. K., & Casals, R. (2003). Determination of Fat, Protein, Casein, Total Solids, and Somatic Cell Count in Goat's Milk by Near-Infrared Reflectance Spectroscopy. *Journal of AOAC International*, 86(4), 746–752.
- Bastin, C., Théron, L., Lainé, A., & Gengler, N. (2016). On the role of mid-infrared predicted phenotypes in fertility and health dairy breeding programs 1. *Journal of Dairy Science*, 1–15. <https://doi.org/10.3168/jds.2015-10087>
- Bhattarai, R. R. (2012). Importance of Goat Milk, 7(October 2014), 107–111. <https://doi.org/10.3126/jfstn.v7i0.11209>
- Boulaaba, A., Grabowski, N., & Klein, G. (2011). Differential cell count of caprine milk by flow cytometry and microscopy. *Small Ruminant Research*, 97(1–3), 117–123. <https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2011.02.002>
- Dagnachew, B. S., Meuwissen, T. H. E., & Ådnøy, T. (2013). Genetic components of milk Fourier-transform infrared spectra used to predict breeding values for milk composition and quality traits in dairy goats. *Journal of Dairy Science*, 96(9), 5933–5942. <https://doi.org/10.3168/jds.2012-6068>
- Dal Zotto, R., De Marchi, M., Cecchinato, A., Penasa, M., Cassandro, M., Carnier, P., ... Bittante, G. (2008). Reproducibility and Repeatability of Measures of Milk Coagulation Properties and Predictive Ability of Mid-Infrared Reflectance Spectroscopy. *Journal of Dairy Science*, 91(10), 4103–4112. <https://doi.org/10.3168/jds.2007-0772>
- García, E. A. B., & Vázquez, H. C. (2012). Mastitis caprina, (October 2012), 1–96.
- Gengler, N., Soyeurt, H., Dehareng, F., Bastin, C., Colinet, F., Hammami, H., ... Dardenne, P. (2016). Capitalizing on fine milk composition for breeding and

management of dairy cows 1. *Journal of Dairy Science*, 99(5), 4071–4079.
<https://doi.org/10.3168/jds.2015-10140>

Givens, D.I., and E.R. Deaville. 1999. The current and future role of near infrared reflectance spectroscopy in animal nutrition: a review. *Aust. J. Agric. Res.* 50:1131 - 1145.

Haenlein, G. F. (2004). Goat milk in human nutrition. *Small Ruminant Research*, 51(2), 155–163. <https://doi.org/10.1016/J.SMALLRUMRES.2003.08.010>

Harmon, R.J., Eberhart, R.J., Jasper, D.E., B.E. Langlois (1990). *Microbiological Procedures for the Diagnosis of Bovine Udder Infection and Determination of Milk Quality*. Nat. Mastitis Counc., Inc., Arlington NMC. Retrieved from <https://books.google.es/books?id=DXsPHQAACAAJ>

Harmon, R. J. 1994. Physiology of mastitis and factors affecting somatic cell counts. *J. Dairy Sci.* 77:2103-2112.

Hogeveen, H. (2005). *Mastitis in Dairy Production: Current Knowledge and Future Solutions*. Netherlands. Wageningen Academic Pub.

InLac. (2016). El sector lacteo en España, 48. Retrieved from http://www.inlac.es/actualidad_publicaciones.php

Kawasaki, M., Kawamura, S., Tsukahara, M., Morita, S., Komiya, M., & Natsuga, M. (2008). Near-infrared spectroscopic sensing system for on-line milk quality assessment in a milking robot. *Computers and Electronics in Agriculture*, 63(1), 22–27. <https://doi.org/10.1016/j.compag.2008.01.006>

Leitner, G., Merin, U., Lavi, Y., Egber, A., Silanikove, N., 2007. Aetiology of intramammary infection and its effect on milk composition in goat flocks. *J. Dairy Res.* 74, 186–193.

Marchi, M. De, Toffanin, V., Cassandro, M., & Penasa, M. (2014). Invited review : Mid-infrared spectroscopy as phenotyping tool for milk traits 1. *Journal of Dairy Science*, 97(3), 1171–1186. <https://doi.org/10.3168/jds.2013-6799>

Marissal, H., & Marinot, C. Intérêt de l'examen clinique mammaire et de la spectrométrie en moyen infrarouge pour le dépistage des mammites chroniques de la chèvre. Thèse d'exercice, Médecine vétérinaire, Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse - ENVT, 2016, 220 p Retrieved from <http://oatao.univ-toulouse.fr/17298/>

McDonald, J. S. and A. J. Anderson. 1981. Total and differential somatic cell counts in secretions from noninfected bovine mammary glands; the peripartum period. *Am. J. Vet. Res.* 42: 1366-1368

Mcparland, S., & Berry, D. P. (2016). The potential of Fourier transform infrared spectroscopy of milk samples to predict energy intake and efficiency in dairy cows 1. *Journal of Dairy Science*, 99(5), 4056–4070. <https://doi.org/10.3168/jds.2015-10051>

Piqué, T. & Vázquez, A., 2012. Uso de espectroscopía infrarroja con transformada de fourier (FTIR) en el estudio de la hidratación del cemento. *Concreto y cemento. Investigación y desarrollo*, 3(2), pp.62–71. <http://www.scielo.org.mx/pdf/ccid/v3n2/v3n2a4.pdf>.

Raynal-Ljutovac, K., Pirisi, A., de Crémoux, R., & Gonzalo, C. (2007). Somatic cells of goat and sheep milk: Analytical, sanitary, productive and technological aspects. *Small Ruminant Research*, 68(1–2), 126–144. <https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2006.09.012>

Sharma, N., Singh, N. K., & Bhadwal, M. S. (2011). Relationship of Somatic Cell Count and Mastitis : An Overview, 24(3), 429–438.

Silva, G. M. 2006. Técnico especialista en laboratorio de atención primaria del instituto catalán de la salud. Temario volumen i. Ed. Mad, S.L. España. 996 pág.

Tsenkova, R., Atanassova, S., Kawano, S., & Toyoda, K. (2001). Somatic cell count determination in cow's milk by near-infrared spectroscopy: A new diagnostic tool. *Journal of Animal Science*, 79(10), 2550–2557.
<https://doi.org/10.2527/2001.79102550x>