



Estudio de la correlación de marcadores lipídicos y  
Proteínas de Fase Aguda mediante técnicas  
moleculares

Study of the correlation of lipid markers and Acute  
Phase Proteins using molecular techniques

Trabajo fin de Máster en Biología Molecular y Celular  
2019-2020

Silvia Calero Martínez

Director: Gabriel Barreda Gómez

Ponente: Fermín Lampreave Palacios

## **Prefacio**

Este Trabajo Fin de Máster se ha desarrollado en el marco de un proyecto de colaboración entre IMG Pharma Biotech S.L., empresa con una década de experiencia en la identificación de biomarcadores y dianas terapéuticas, y Welfare Tracker S.L., empresa que proporciona soluciones para el control y mejora del bienestar animal en explotaciones ganaderas.

El trabajo experimental se ha realizado bajo la tutela de IMG Pharma, en los laboratorios de la empresa en el Parque Científico y Tecnológico de Bizkaia, en Derio, y para la que se ha aplicado su *know-how* en el campo de la lipidómica y su experiencia en biomarcadores.

Me gustaría agradecer a IMG Pharma y Welfare Tracker la oportunidad que me han brindado de formar parte de un proyecto tan ambicioso e ilusionante haciéndome sentir partícipe.

Gracias a Egoitz Astigarraga, Gabriel Barreda, Roberto Fernández y Miguel de la Fuente por dedicarme vuestro tiempo, experiencia y paciencia para ayudarme a llevar a término este trabajo. Hicisteis sencillo el proceso de aprendizaje y convertisteis mi estancia en una magnífica experiencia.

Gracias a Maddalen, Ane y Laura por hacerme sentir en IMG Pharma como en casa.

Gracias a Roberto, Pedro, Ignacio, Carlos, Miguel, Antonio y Miren por abrirnos las puertas de sus granjas y facilitarnos las muestras, espero de corazón que el esfuerzo invertido en este proyecto repercuta de manera positiva en todos ellos.

Gracias Fermín por embarcarte en este trabajo a pesar de la complejidad logística que ha presentado desde el principio, por tu atención y predisposición.

## Índice

1. Resumen .....	1
2. Abstract.....	2
3. Introducción.....	3
3.1. La leche de vaca: situación actual .....	3
3.2. Los lípidos en la leche .....	4
3.3. Variabilidad en la composición .....	6
3.3.1. Genética.....	6
3.3.2. Alimentación .....	7
3.3.3. Estado del ciclo de la lactación y lactaciones acumuladas .....	7
3.3.4. Estado fisiológico: patologías.....	8
3.3.5. Estado fisiológico: bienestar animal.....	10
3.4. El bienestar animal .....	11
3.4.1. Evaluación del bienestar: Welfare Quality® .....	12
3.5. Índices fisiológicos de bienestar animal: la haptoglobina .....	14
3.6. Perspectivas de futuro.....	14
4. Hipótesis y objetivos .....	16
5. Metodología.....	17
5.1. Diseño experimental y muestreo .....	17
5.2. Detección de haptoglobina .....	19
5.3. Espectrometría de masas MALDI-TOF .....	21
5.4. Procesado de espectros .....	23
5.5. Análisis estadístico .....	24
5.5.1. Prueba F de Fisher .....	24
5.5.2. T-test.....	24
5.5.3. Prueba de Levene.....	24
5.5.4. Test ANOVA de un factor.....	24

5.5.5. Coeficiente de correlación de Pearson.....	25
5.5.6. Análisis de componentes principales (PCA) .....	25
6. Resultados y discusión .....	26
6.1. Determinación de las condiciones óptimas para la detección de haptoglobina...	26
6.2. Estimación de la prevalencia de cursos subclínicos en animales no diagnosticados y de cursos agudos en animales diagnosticados .....	30
6.3. Obtención de los perfiles lipídicos e identificación de posibles marcadores .....	33
6.3.1. Identificación de las diferencias en el perfil lipídico de la leche de vacas sanas y vacas patológicas: marcadores lipídicos de estado sanitario .....	34
6.3.2. Perfil lipídico de muestras de leche en función de su concentración de haptoglobina .....	36
6.3.3. Valoración del perfil lipídico de la leche de vacas sanas y patológicas en cada una de las granjas.....	38
6.3.4. Determinación de las diferencias en el perfil lipídico de las muestras de leche en función de su origen.....	45
7. Conclusiones.....	51
8. Conclusions .....	52
9. Bibliografía.....	53
Anexo I.....	59
Anexo II.....	60

## 1. Resumen

Los productores de leche y derivados se enfrentan desde hace un siglo al reto de responder a la demanda de la sociedad europea de disponer de garantías de una producción con bienestar animal. Durante los últimos años se han adoptado medidas para mejorar las condiciones de los animales en las explotaciones y desarrollado sistemas de evaluación que permiten certificarlas, como el protocolo Welfare Quality®. Sin embargo, se continúan buscando herramientas y determinaciones objetivas que garanticen el efecto positivo de las modificaciones adoptadas sobre los animales. Entre los marcadores que se utilizan para ello destacan las proteínas de fase aguda siendo la haptoglobina la más relevante en leche. Las muestras analizadas han presentado un veinticinco por ciento de animales sanos con niveles indicativos de estrés o fase aguda en la leche indicando una pérdida de bienestar en las explotaciones lecheras. Una de las estrategias para reducir esta ratio, es la prevención y la detección temprana. Dado que los lípidos son una fracción de gran importancia en este alimento, el estudio de su lipidoma mediante la espectrometría de masas resulta de gran interés. En este estudio se han identificado dos especies lipídicas que se presentan como potenciales biomarcadores del estado sanitario de las vacas lecheras, permitiendo discriminar tanto la leche de animales enfermos como aquella con una concentración de haptoglobina indicativa de estrés o fase aguda. Adicionalmente, mediante el estudio lipidómico de estas muestras se han podido determinar biomarcadores lipídicos que permiten identificar el origen de la muestra en función del grado de libertad del que disponen los animales en la granja. Este grado de libertad de los animales y su capacidad de movimiento repercute directamente en el bienestar animal, postulándose así la lipidómica como una potente herramienta en el apoyo de toma de decisiones para prevención y el control sanitario de las explotaciones ganaderas de producción láctea.

## 2. Abstract

For a century now, producers of milk and dairy products have been faced with the challenge of responding to European society's demand for guaranteed animal welfare production. In recent years, measures have been taken to improve animal conditions on farms and evaluation systems have been developed to certify them, such as the Welfare Quality® protocol. However, the search continues for tools and objective determinations that assure the positive effect of the adopted changes on the animals. Among the markers used for this purpose, acute phase proteins stand out, being haptoglobin the most relevant in milk. The samples analysed showed twenty-five percent of healthy animals with levels indicating stress or acute phase in the milk showing a loss of welfare on the dairy farms. One of the strategies to reduce this ratio is prevention and early detection. Since lipids are a very important fraction in this feed, the study of their lipidome by mass spectrometry results of uttermost interest. In this study we have been able to identify two lipid species that are presented as potential biomarkers of health status in dairy cows. These two lipids allow the discrimination of milk from sick animals and also of milk with haptoglobin concentration levels that are indicative of stress or acute phase. In addition, lipidomic characterization of these samples, has led to determination of lipid biomarkers enable the identification of the origin of the sample according to the degree of freedom the animals have on the farm. This degree of freedom of the animals and their ability to move has a direct impact on animal welfare. Lipidomics is therefore a powerful tool for supporting decision-making for the prevention and health control in dairy farms.

### 3. Introducción

#### 3.1. La leche de vaca: situación actual

La leche, según su definición legal establecida en el Reglamento (CE) nº 853/2004, es la secreción mamaria de animales de abasto sanos y que no presentan heridas o inflamación de la ubre, diferente del calostro y que, en el caso de encontrarse cruda, no ha superado los 40 °C. El ganado bovino es el principal productor de leche para consumo humano, así como para la elaboración de derivados en la Unión Europea (UE) y en España.

La leche es un alimento básico, completo y equilibrado que presenta un alto contenido de nutrientes esenciales de manera proporcionada entre sí y en relación con su aporte calórico (Fernández et al., 2015). El principal componente de la leche de vaca es el agua, constituyendo un 87% de media del total. Además, presenta entre un 4 y un 5% de lactosa, un 3% de proteínas, entre un 3 y un 4% de grasa, un 0,8% de minerales y un 0,1% de vitaminas (Pereira, 2014). La leche de vaca fresca constituye un elemento altamente presente en la dieta española cuyo consumo se mantiene estable a lo largo de los años. Sin embargo, al igual que en el resto de Europa, se está produciendo una evolución hacia el consumo de productos procesados como la nata o la crema en primer lugar, seguidos por el queso. Esa tendencia se espera sea sostenida durante la próxima década según las perspectivas agrícolas de la FAO (de sus siglas en inglés *Food and Agriculture Organization*) y la OCDE (Organización para la Cooperación y Desarrollo Económicos) de 2019.

La producción europea mantiene un crecimiento sostenido durante los últimos años, paralela a la producción española, a pesar de la variación estacional. Simultáneamente a este aumento productivo que ha sucedido durante los últimos tres años, se ha producido un aumento del valor económico pagado a los productores (Subdirección General de Producciones Ganaderas y Cinegéticas y Dirección General de Producciones y Mercados Agrarios, 2020). Esta materia prima posteriormente es procesada tanto como para la venta directa, ya que generalmente es tratada térmicamente para garantizar la seguridad alimentaria, tanto como para ser utilizada como materia prima para productos lácteos derivados o destinada a la venta de sus componentes por separado.

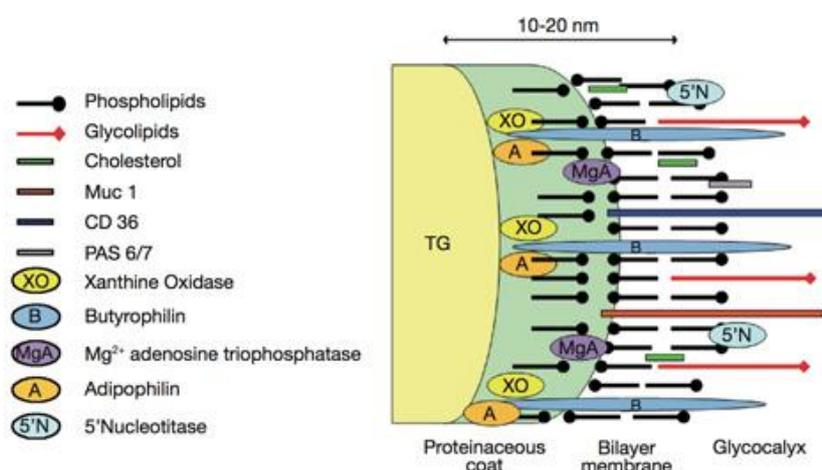
En España, el grueso de la producción láctea (39%) en enero de 2020 se destinó a la comercialización de leche de consumo directo, mientras que en la UE el 38% de la leche cruda producida en este mismo periodo se destinó como materia prima para la elaboración

de queso (Subdirección General de Producciones Ganaderas y Cínicas y Dirección General de Producciones y Mercados Agrarios, 2020).

Estos cambios en las tendencias en los hábitos de consumo y, por tanto, en la distribución productiva en la industria láctea, provocan que aumente el valor de ciertos componentes implicados en este tipo de procesado. Uno de los más relevantes es la grasa láctea, dado que la mayoría de productos lácteos sufre una disminución del porcentaje de agua respecto a la leche, cobrando mayor relevancia el extracto seco y más concretamente, los lípidos responsables del aroma y el sabor de estos productos, como el queso (Michalsky et al., 2003).

### 3.2. Los lípidos en la leche

La grasa láctea está compuesta por tres clases de sustancias asociadas: lípidos neutros, mayoritariamente triglicéridos (98%); lípidos polares, principalmente fosfolípidos de naturaleza compleja (1%); y sustancias insaponificables (< 1%) (Alais, 1985). La mayor parte de la grasa láctea se encuentra en la leche en una distribución de emulsión compleja protegida por membranas, constituyendo estructuras conocida como glóbulos grasos. Los triglicéridos de alto punto de fusión, colesterol y ésteres de retinol conforman el núcleo de los glóbulos grasos (Walstra et al., 2001). Las membranas de los glóbulos grasos están compuestas por lípidos, proteínas y minerales que permiten la emulsión de los componentes apolares y protegen las grasas de la acción de lipasas y enzimas lipolíticas. Se trata de una estructura con tres capas (ver Figura 1), entre las que se encuentran infiltradas proteínas, fosfolípidos, esfingolípidos, glicoproteínas, lípidos neutros, enzimas y otros componentes minoritarios.



**Figura 1.** Modelo esquemático de la membrana de los glóbulos grasos publicado por Vanderghem et al. en 2010 inspirado en datos de estudios anteriores.

La capa interna es una monocapa que tiene su origen en el retículo endoplasmático y rodea las gotículas de lípidos desde su síntesis intracelular. En esta capa, las colas hidrofóbicas de los lípidos polares se encuentran orientadas hacia el núcleo, entrando en contacto con los triglicéridos. Las otras dos capas que componen la membrana del glóbulo conforman una bicapa cuyo origen es la membrana plasmática apical de las células secretoras del tejido mamario, en la que las cabezas hidrofílicas de los lípidos polares quedan en contacto con la fase acuosa de la leche (Vanderghem et al., 2010).

La estabilidad de los glóbulos grasos está directamente implicada en la calidad de la leche tanto organoléptica, nutricional como tecnológica y esta depende de la composición y estructura de la membrana (Vanderghem et al., 2010), debido a ello se presentan como un objeto de estudio de gran relevancia y de gran interés para la industria. Los lípidos que componen la membrana del glóbulo graso, a pesar de tratarse de un porcentaje minoritario del total, resultan de alto valor biológico y con potencial para causar efectos fisiológicos beneficiosos en la salud (Morin, Jiménez-Flores y Pouliot, 2007). Entre los lípidos complejos y polares de la membrana se pueden encontrar componentes bioactivos con una repercusión favorable en enfermedades degenerativas asociadas a la edad, como el Alzheimer, y en el desarrollo de ciertos cánceres, como los tumores en el colon o los carcinomas. Todo ello se asocia a sus actividades neuroprotectora, anticancerígena y antioxidante (Ahn, Ganesan y Kwak, 2011). Por ejemplo, los esfingolípidos, que representan un importante porcentaje de los lípidos de la membrana, presentan efectos bactericidas, concretamente, se ha observado un elevado efecto protector de ciertas especies de esfingolípidos en la dieta frente a infecciones gastrointestinales por *Campylobacter jejuni*, *Listeria monocytogenes* y *Clostridium perfringens*. También se les atribuyen efectos anticolesterolémicos que podrían tener una influencia positiva en síndromes metabólicos como la diabetes, o enfermedades cardiovasculares (Dewettinck et al, 2008).

Las características de estos lípidos que permiten la distribución de la grasa en la leche son de gran interés tecnológico. La composición y el tamaño de los glóbulos grasos afecta al posterior procesado de la leche en la industria alimentaria, afectando a la calidad del producto final (Michalski et al., 2003). En los productos lácteos con base gelificada, como el yogur o el queso, la interacción entre los lípidos y las proteínas tiene lugar gracias a los componentes de la membrana del glóbulo graso. Dada la complejidad de este tipo de moléculas es posible la formación de diferentes tipos de estructuras que se encuentran en

la gran mayoría de los productos lácteos derivados, y cobrando una mayor relevancia en los geles ácidos y los quesos madurados. Los fosfolípidos de la membrana presentan propiedades emulsionantes y espumantes con un valor relevante para la industria alimentaria en el desarrollo de nuevos ingredientes (Dewettinck et al., 2008). Una de las aplicaciones que podrían desarrollarse a partir de la investigación en estos componentes, es la utilización de estos para la formación de micelas que permitan transportar nutrientes liposolubles, cuya carencia en la dieta o malabsorción como consecuencia de una baja biodisponibilidad puedan producir problemas de salud. Algunos de ellos son los  $\alpha$ -tocoferoles, los carotenoides o la vitamina D<sub>3</sub>. En el caso de esta última se ha propuesto una mejora de la biodisponibilidad gracias a la interacción con las membranas de las micelas (Bezalgues et al., 2009).

### **3.3. Variabilidad en la composición**

La composición láctea no es constante, las causas por las que suceden estos cambios son numerosas y con un peso relativo todavía por determinar. Algunas de las más relevantes son:

#### **3.3.1. Genética**

La raza más importante en el sector lácteo bovino en España es la raza Holstein, conocida también como vaca frisona. Esta especie está integrada en nuestro país, a pesar de que es originaria de la región de Frisia, en Holanda (MAPA, 2020). Se trata del resultado de la presión selectiva que se ha realizado durante el último siglo para obtener razas con aptitudes diferentes (producción de carne, resistencia a condiciones extremas, producción de leche) (Walstra et al., 2001). Esto sumado a los programas nacionales de mejora, cuyo objetivo es mejorar las características fenotípicas y genotípicas en poblaciones reproductoras, bien para conservar, reconstruir o crear una raza, ha provocado que las variaciones en la composición, así como en el rendimiento lácteo, sufran variaciones mucho más bajas debido a este factor (Walstra et al., 2001; MAPA, 2020).

Durante los últimos 40 años, se ha realizado una selección de los individuos con el objetivo de producir un aumento de la producción láctea. De esta forma, hoy en día muchos animales alcanzan el volumen de producción de 20 000 kg de leche por lactación, mientras que, en los años 80, el máximo era de 4 500 kg (Oltenucu y Broom, 2010).

Sin embargo, la genética de cada individuo influye de una manera más relevante, llegando a tener más peso que el de la raza (Walstra et al., 2001).

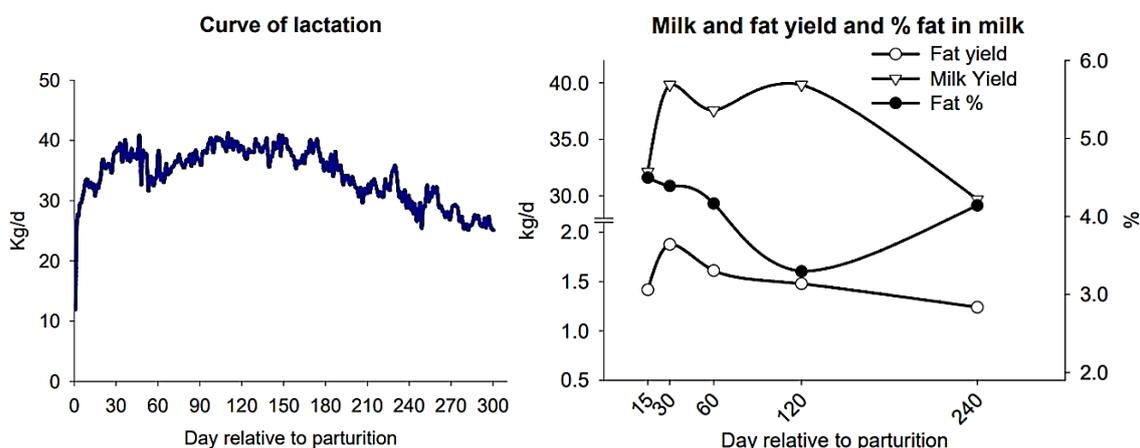
### 3.3.2. Alimentación

El tamaño de la ración y el contenido energético al que los animales tienen acceso tiene un efecto directo sobre el rendimiento lechero. La ración alimentaria puede modificar el contenido graso y especialmente la composición de la grasa (Chilliard et al., 2007). Durante los últimos años, se han dedicado grandes esfuerzos investigadores para determinar la ración óptima para el ganado bovino en función del estado fisiológico de los animales, incluyendo suplementos alimenticios apropiados en el caso de que existan limitaciones para conseguir los requerimientos a través de los piensos y los forrajes. La suplementación, en función de su composición, genera variaciones en la cantidad de grasas y su composición y en los componentes nitrogenados no proteicos (Keady et al., 2001). En este aspecto, también se ha determinado que los animales con acceso *ad libitum* al pienso o forraje, generan una mayor cantidad de extracto seco en la leche, que los animales cuya ración está subordinada al manejo en la granja (Llonch et al., 2018).

Por otro lado, acciones específicas como el acceso a pasto tiene un efecto sobre la síntesis de lípidos, provocando un aumento en comparación con diferentes ensilados cuya composición y humedad puede variar, pero cuyo origen siempre son forrajes secos (Alais, 1985; Rodríguez y Ponce, 2004).

### 3.3.3. Estado del ciclo de la lactación y lactaciones acumuladas

En condiciones normales, sin variaciones en la alimentación de los animales, la composición y la producción lácteas son variables en función del momento en el ciclo de lactación en el que se encuentre el animal (Ver Figura 2).



**Figura 2.** A la izquierda: evolución del rendimiento lechero (en kg de leche producidos al día) a lo largo de un ciclo de lactación, siendo el día 0 el momento del parto y el día 305 el final del ciclo natural. A la derecha: comparación del rendimiento lechero junto con el rendimiento de producción de grasa y el porcentaje que esta representa en el total de la leche a lo largo del ciclo de una lactación. (Bionaz y Loor, 2008).

Durante los dos primeros meses se produce un aumento del rendimiento lechero, hasta alcanzar el pico de máxima producción tras dos meses desde el parto. A partir de esta fase, se produce una depleción del volumen de leche que se puede obtener del animal hasta el secado previo al próximo parto (Alais, 1985). La regulación de la síntesis lipídica durante la lactación, así como el rendimiento lácteo es producto de una compleja red de genes con cierta carga de regulación postranscripcional, mediada por los estímulos hormonales que sufre el animal (Bionaz y Loor, 2008). Debido a ello, se observan variaciones en las curvas de rendimiento lácteo cuando comienza la siguiente gestación. Suele producirse un ligero aumento de la producción láctea, pero se mantiene la tendencia descendiente hasta el secado, previo al parto.

Por otro lado, también afecta el número de lactaciones que ha tenido la vaca. Los animales con más de tres lactaciones alcanzan un pico de producción mayor, sin embargo, el descenso es notablemente más pronunciado, sufren menos el efecto de la nueva gestación y el volumen final producido durante dicha lactación, es menor. Estos cambios empiezan a ser notables a partir del segundo parto y continúan incrementándose hasta estabilizarse a partir del tercero (Keown et al., 1988).

### **3.3.4. Estado fisiológico: patologías**

El mejor ejemplo del efecto del estado fisiológico de los animales es el padecimiento de una enfermedad. Como consecuencia de la selección genética de animales, se ha forzado una mayor incidencia de ciertas enfermedades frente a otras, debido a la predisposición genética de los animales a sufrir determinado tipo de patologías. Las más comunes que se encuentran hoy en día en las granjas lecheras son las infecciones que producen mamitis, cojeras, metritis y el desplazamiento del abomaso (Oltenacu y Broom, 2010). La cojera presenta una prevalencia de entre el 5 y el 22% en granjas europeas (Blanco-Penedo et al., 2020). Sin embargo, la afección más común que se da en las granjas de ganado lechero es la mastitis, con una incidencia que alcanza hasta el 54,5% durante el periodo de lactancia y que también puede darse durante el periodo seco (Ruegg, 2014).

La mastitis o mamitis es el proceso inflamatorio de la ubre debido a una infección en el tejido, que puede ser provocada por diferentes especies de microorganismos (Ver Figura 3). Tiene una importante relevancia en la industria láctea, ya que puede conducir a la muerte de animales e, inevitablemente, produce pérdidas económicas importantes. El proceso de mastitis provoca un descenso del rendimiento lácteo, requiere la retirada de

animales de la rutina productiva, supone gastos de tratamiento y prevención y las alteraciones en la composición de la leche repercuten en su calidad (Gomes y Henriques, 2016).



**Figura 3.** A la izquierda, detalle de una ubre sana perteneciente a un animal en rotación de ordeño de la granja FTR en la que se tomaron muestras para este proyecto. A la derecha, detalle de la ubre de un animal de la misma granja que padecía una mamitis no enterocolítica.

Los animales con un alto rendimiento lácteo tienen una mayor predisposición a desarrollar mamitis y sufrir pérdidas mayores en la producción láctea que las de producción más baja. Sin embargo, todos los animales son susceptibles de sufrir este tipo de infección y las alteraciones en la leche son diferentes en los casos clínicos y subclínicos y variables en función del agente causante de la infección (Heikkilä et al., 2018).

A pesar de ello, las técnicas diagnósticas de esta patología se basan en el recuento de células somáticas en la leche de manera rutinaria, diariamente en el tanque y con recuentos individuales de forma mensual en las granjas (Ruegg, 2017). En el caso de la detección previa a la sintomatología, se utilizan métodos de cultivo bacteriano combinado con el recuento de células somáticas, lo que es complejo ya que se trata de una cuantificación de células bacterianas viables sin identificar, algunos de los géneros además con dificultad para su cultivo, como *Mycoplasma*. Sin embargo, estas técnicas tienen un coste elevado y sólo se aplican en la realización de estudios.

Es por ello, que el sector continúa buscando soluciones y recursos para prevenir y minimizar el impacto de las infecciones mamarias. Grandes compañías, como Toshiba Corporation, han mostrado interés en este campo desarrollando nuevas tecnologías de diagnóstico más precisas y rápidas como la propuesta por Kawai et al. en 2017. Consiste en la aplicación de una técnica de amplificación: LAMP (Loop-mediated isothermal amplification) integrado en un chip con el objetivo de detectar ADN del patógeno

causante de la infección con la especificidad y la rapidez de una PCR (de sus siglas en inglés, *Polymerase Chain Reaction*).

### **3.3.5. Estado fisiológico: bienestar animal**

El bienestar animal se ha entendido tradicionalmente como un correcto estado sanitario de los animales, así como un buen rendimiento productivo. Si bien estos dos conceptos están íntimamente ligados, la idea de bienestar animal actual incluye cómo se siente el animal. Este punto de vista tiende a evitar estímulos que provoquen reacciones afectivas negativas en los animales y a promover los que generan respuestas afectivas positivas (von Keyserlingk y Weary, 2017).

El bienestar animal, entendido como consecuencia del manejo, es decir de origen exógeno, se considera el efecto de factores externos sobre el animal, y la repercusión o la relevancia que tenga sobre el mismo está marcada por sus características genotípicas y fenotípicas (Oltencu y Broom, 2010). Durante el último siglo, se ha primado la selección de individuos para reproducción, en base a caracteres fenotípicos relacionados con el rendimiento productivo y la adaptación a las zonas de producción. Esta selección ha tenido un efecto sobre el bienestar de los animales, puesto que la presión selectiva focalizada en un factor implica la transmisión de otros, que imprimen una susceptibilidad mayor al desarrollo de unas enfermedades frente a otras o un descenso de la fertilidad (Oltencu y Algers, 2005).

Existen diferentes procesos sobre los que el estrés o la pérdida de bienestar tiene un efecto negativo, interrelacionados entre sí, y que pueden presentar un efecto sobre la composición y la calidad de la leche. Uno de los ejemplos más evidentes es el de los hábitos alimentarios. Se trata de indicadores bidireccionales del estado de bienestar de un animal. Una mala alimentación o un cambio en los hábitos alimentarios de los animales pueden ser consecuencia u origen de sufrimiento o problemas en el bienestar del animal, que generan alteraciones en la composición de la leche (Llonch et al., 2018).

De manera general, la pérdida del estado de bienestar en los animales, independientemente del su origen (exógeno o endógeno), produce un importante descenso en el rendimiento productivo además de provocar cambios en la composición (Polsky y von Keyserlingk, 2017).

### 3.4. El bienestar animal

La idea de bienestar animal es un concepto ético, y por tanto subjetivo. Esto no impide que la ciencia se haya convertido en la base de este movimiento social, así como en una herramienta de gran relevancia para abordar esta problemática y poder anticiparse a los inconvenientes que deriven de ello (von Keyserlingk y Weary, 2017).

El concepto actual de bienestar animal, aceptado por la mayoría de los autores, es la propuesta de Fraser et al. en 1997. En ella, el bienestar animal responde a tres cuestiones:

- ¿Es funcional el animal?
- ¿El animal se siente bien?
- ¿Puede vivir el animal una vida razonablemente natural?

Si el resultado es afirmativo, en todas ellas, se darán las condiciones para considerar que un animal dispone de bienestar. Sin embargo, estos campos están relacionados entre sí, por lo que la alteración de uno sólo de ellos provocará la pérdida del equilibrio y, por tanto, la pérdida del bienestar (ver Figura 4).



**Figura 4.** Representación gráfica de la superposición de las áreas de influencia del bienestar animal (Von Keyserlingk et al., 2009).

Por ejemplo, un día de mucho calor, en el que el animal en la naturaleza buscaría una sombra para resguardarse, si no dispone de ella, se estará alterando el comportamiento natural de la vaca. Al no conseguir encontrar un lugar menos cálido, el animal empieza a sentir incomodidad y estrés, empeorando su estado afectivo. La hipertermia repercute en sus funciones biológicas, así como el estrés generado por ella, y en vacas en lactación provoca una disminución de la producción láctea y cambios en su composición (von Keyserlingk et al., 2009).

Las causas que pueden desencadenar la pérdida del bienestar son muy variadas, entre ellas tener poco espacio para moverse, la suciedad, una alimentación poco apropiada o el desarrollo de cojeras o problemas de movilidad. La investigación científica en los últimos años se ha centrado en conocer el efecto de estas cuestiones de manera individual sobre el bienestar de los animales (von Keyserlingk y Weary, 2017).

### 3.4.1. Evaluación del bienestar: Welfare Quality®

La elaboración de sistemas de evaluación que integren todos los factores que influyen en el estado de bienestar de los animales es una tarea compleja, y en el intento de lograrlo se han desarrollado cientos de sistemas de evaluación, con diferentes fortalezas y debilidades. Los más relevantes actualmente son:

- European Welfare Quality® Assessment Protocol dairy cattle (WQ), de aplicación en la Unión Europea.
- Dairy Farmers Assuring Responsible Management Program (FARM), de aplicación en Estados Unidos.
- The Code of Welfare: Dairy Cattle (The Code), aplicado en Nueva Zelanda.

Estos tres programas son los más aceptados y de mayor aplicación en sus respectivos territorios. Se crearon atendiendo a las necesidades y factores más importantes en cada tipo de producción (Krueger et al., 2020).

El proyecto del Welfare Quality® surge en la Unión Europea en 2004 como respuesta a una demanda de la sociedad, obtenida a través de diferentes encuestas y estudios de mercado llevados a cabo por la Comisión Europea. Se trata del mayor estudio transversal en el área del bienestar desarrollado hasta la fecha, e incluyó la investigación de cuarenta centros de investigación europeos y cuatro latinoamericanos, estos últimos desde 2006 (Blokhus, 2008).

El resultado de más de cinco años de investigación fue un protocolo de enfoque multidisciplinar basado en cuatro principios, que se desglosan en doce criterios y se evalúan a través de 30 medidas puntuadas entre 0 y 100, siendo 100 la puntuación más alta y 0 la más baja (ver Tabla 1) (Krueger et al., 2020; Consorcio Welfare Quality®, 2009).

Obtener un buen resultado en las auditorias de este protocolo otorga un reconocimiento de calidad ampliamente reconocido, pero no es normativa obligatoria, a pesar de tener su origen en los estudios financiados por la Unión Europea. Es un método para poner en valor el bienestar animal y estimular la mejora en las granjas y entre los productores, que, hoy, viene exigido por gran parte de la industria del procesado lácteo (de Vries et al., 2013; Krueger et al., 2020).

Principios	Criterios de bienestar	Medidas
Buena alimentación	Ausencia de hambre prolongada	Condición corporal
	Ausencia de sed prolongada	Suministro de agua, limpieza de los bebederos, flujo de agua, funcionamiento de los bebederos
Buen alojamiento	Confort durante el descanso	Tiempo necesario para tumbarse, animales que colisionan con el equipamiento del alojamiento cuando se tumban, animales tumbados parcial o totalmente fuera del área de descanso, limpieza de la ubre, limpieza del cuarto trasero superior y limpieza del cuarto trasero inferior
	Confort térmico	<i>No hay medida desarrollada</i>
	Facilidad de movimiento	Presencia de ataduras, acceso a un área exterior de ejercicio o pasto
Buena salud	Ausencia de lesiones	Cojera (animales en movimiento), cojera (animales atados), alteraciones del integumento
	Ausencia de enfermedades	Tos, secreción nasal, secreción ocular, respiración dificultosa, diarrea, secreción vulvar, recuento de células somáticas de la leche, mortalidad, distocia, vacas caídas
	Ausencia de dolor inducido por el manejo	Desmochado/descornado, corte de la cola
Comportamiento apropiado	Expresión de conductas sociales	Conductas agonistas
	Expresión de otras conductas	Acceso a pasto
	Buena relación humano-animal	Distancia de huida
	Estado emocional positivo	Evaluación cualitativa de la conducta

**Tabla 1.** Resumen del esquema seguido por el protocolo Welfare Quality® en ganado vacuno de leche (Consortio Welfare Quality®, 2009).

A pesar de la aceptación general que existe con respecto de este protocolo, se ha generado un debate acerca del peso que tienen cada uno de los criterios sobre la puntuación final de un rebaño y la influencia individual de cada auditor. Las medidas requeridas, en su mayoría, son de carácter observacional, de manera que quedan expuestas a varios tipos de sesgo (de Graaf et al., 2017; Blanco-Penedo et al., 2020). Esta es una de las limitaciones del sistema que más debate genera entre los usuarios, por lo que se ha convertido en uno de los objetivos para el desarrollo de mejoras. Una de las propuestas que se sugiere para solventar este problema, es la formación de técnicos utilizando recursos visuales para minimizar la necesidad del juicio del analista, al enfrentarlo a referencias conocidas para él (Blanco-Penedo et al., 2020).

Sin embargo, una de las tareas pendientes es el enfrentamiento de las medidas observacionales basadas en animales con índices fisiológicos que no estén relacionados con la producción. Es necesaria una validación científica de que las determinaciones realizadas con los sistemas actuales de evaluación del bienestar animal incurren en mejoras o adaptaciones que repercuten directamente en el estado de los animales (Krueger et al., 2020).

### **3.5. Índices fisiológicos de bienestar animal: la haptoglobina**

La respuesta de fase aguda es una reacción inespecífica que forma parte del sistema inmunitario innato. Durante este proceso se suceden diferentes cambios, entre ellos una alteración de la concentración de proteínas de fase aguda (PFA). Las PFAs se encuentran en la sangre y su concentración varía como respuesta a varios procesos inflamatorios o no inflamatorios. Existen dos tipos de PFA, positivas y negativas; la concentración de las positivas aumenta y la de las negativas disminuye cuando el animal sufre una perturbación de su sistema inmunitario (Bagga et al., 2016; Alonso-Fauste et al., 2012; Manimaran et al., 2016).

La haptoglobina es la PFA que mayor cambio experimenta en el ganado bovino de leche tanto en suero sanguíneo como en leche, aumentando su concentración entre 10 y 100 veces respecto al nivel basal. Se ha estudiado la correlación de la presencia de haptoglobina en suero y en leche con el padecimiento de diferentes patologías, determinando que es un marcador inespecífico de enfermedad, inflamación o estrés (Huzzey et al. 2009; Alonso-Fauste et al., 2012).

Esto ha suscitado interés por la industria láctea, ya que la determinación de haptoglobina podría convertirse en un biomarcador de bienestar y, por tanto, de calidad de la leche (Åkerstedt et al., 2006). Se propone como una potencial herramienta para la predicción y la detección precoz de importantes enfermedades y patologías para el ganado bovino de leche como la metritis o la mamitis, así como del padecimiento de estrés (Grönlund, Hallén y Persson, 2004; Huzzey et al., 2009; Hiss et al., 2007).

### **3.6. Perspectivas de futuro**

La industria láctea es una de las más grandes e importantes de las que conforman el sistema agroalimentario en España y en la Unión Europea. La materia prima de la que se nutre es la leche procedente de las ganaderías a las que cada vez se exige una mayor garantía de bienestar animal como respuesta a la demanda de la sociedad. Además, la

mejora de las condiciones y el estado completo de bienestar de los animales minimiza las pérdidas como consecuencia de enfermedades o como respuesta al estrés y genera una mejora productiva (Åkerstedt et al., 2006; von Keyserlingk et al., 2009). En el plan de mejora continua de los sistemas de bienestar actuales, se buscan herramientas de prevención y predicción que permitan anticipar situaciones que provoquen estrés o enfermedades y permita reducir sus consecuencias (von Keyserlingk y Weary, 2017).

Enmarcado en este contexto se sitúa este proyecto de investigación que tiene el objetivo de aplicar la tecnología más actual al campo de la ganadería lechera, enfocados en los componentes de mayor relevancia y repercusión en la industria.

## 4. Hipótesis y objetivos

La hipótesis que se plantea en este proyecto es que el estrés, los procesos inflamatorios y patológicos tienen un efecto sobre el perfil lipídico de la leche de vaca. Se estima que es posible identificar procesos subclínicos o asintomáticos en los primeros estadios del curso de una enfermedad a través de la detección de haptoglobina en leche y que estos procesos implican una alteración específica e identificable de la composición de la grasa láctea. En el caso de poder identificar estas moléculas, sería posible determinar nuevos biomarcadores en la detección precoz de patologías en el ganado bovino de producción lechera.

En el desarrollo de este trabajo se trata de demostrar experimentalmente la validez de la hipótesis a través de los siguientes objetivos:

- Determinación de las condiciones óptimas para la determinación de haptoglobina mediante el sistema desarrollado por IMG Pharma.
- Estimación de la prevalencia subclínica de estrés o patologías mediante la detección de haptoglobina en muestras de leche de animales sin enfermedades diagnosticadas y determinación de los animales que padecen un curso agudo de una enfermedad o patología diagnosticada.
- Identificación de una o varias especies lipídicas características de la leche de animales que sufren mastitis y otras patologías mediante la elaboración del perfil lipídico de su leche fresca empleando la espectrometría de masas MALDI-TOF.
- Búsqueda de una correlación entre la presencia de haptoglobina, como marcador de estrés, inflamación o proceso patológico, con la presencia o ausencia de las especies lipídicas identificadas como características en los animales enfermos.
- Evaluación del perfil lipídico de la leche de los tanques en relación con las de los animales de la misma explotación.
- Valoración de las diferencias en los perfiles lipídicos consecuencia de la diferente alimentación y el manejo propio de cada explotación.

## 5. Metodología

### 5.1. Diseño experimental y muestreo

Las muestras de leche fresca para este proyecto se tomaron en granjas del Norte de España, de Navarra y Aragón (ver Tabla 2). En las cinco granjas navarras se tomaron muestras de leche a 5 animales que se encontraban en el rebaño y formaban parte de la rotación del ordeño. Se trata de muestras de animales considerados sanos o no diagnosticados que podrían, o no, presentar un cuadro subclínico debido al estrés, a encontrarse en estados tempranos del desarrollo de una enfermedad o de una infección. Se recogieron un total de 25 muestras de 50 mL de leche tomadas directamente de las ubres. Una vez extraídas, todas ellas se sometieron a congelación para su almacenamiento a -20 °C hasta la realización de los análisis.

Referencia de la granja	Abreviatura	Localización
<b>Alfajarín</b>	ALF	<u>Valle del Ebro</u> Localidad de la Comarca Central de Zaragoza
<b>Miralbueno</b>	MRB	<u>Valle del Ebro</u> Distrito de la ciudad de Zaragoza
<b>Montañana</b>	MNT	<u>Valle del Ebro</u> Barrio rural de la ciudad de Zaragoza
<b>Movera</b>	MVR	<u>Valle del Ebro</u> Barrio rural de la ciudad de Zaragoza
<b>Marcilla</b>	MAR	<u>Ribera del Ebro</u> Localidad de la Comarca Ribera Arga-Aragón
<b>Valtierra</b>	VTR	<u>Ribera del Ebro</u> Localidad de Comarca de la Ribera de Navarra
<b>Murchante</b>	MCH	<u>Ribera del Ebro</u> Localidad de la Comarca de Tudela
<b>Fitero</b>	FTR	<u>Ribera del Ebro</u> Localidad de la Comarca de La Ribera
<b>Illarregui</b>	ILR	<u>Valle de Ultzama</u> Localidad de la Comarca de Ultzamadea

**Tabla 2.** Referencias de las granjas, abreviaturas para la identificación de las muestras procedentes de cada una de ellas e identificación de la zona de origen de cada granja.

Paralelamente, en algunas de estas mismas instalaciones se tomaron muestras de los animales disponibles apartados del resto debido a razones médicas, que bien se encontraban enfermos, en tratamiento o durante el periodo de supresión. Se seleccionaron de entre animales los apartados del rebaño aquellos que sufrían un proceso inflamatorio

o patológico, con el objetivo de encontrar entre estos, concentraciones aumentadas de haptoglobina en leche, evitando los animales que se encontraban en el periodo de supresión. El periodo de supresión es el tiempo que animales que han sido tratados con medicamentos veterinarios son separados del resto para evitar que los residuos o metabolitos de dichas sustancias lleguen a productos de consumo humano (Art. 2, RD 1246/2008, de 11 de julio).

Se tomaron un total de 14 muestras de leche de animales en proceso patológico de un volumen de 50 mL que se congelaron y mantuvieron a -20 °C hasta el procesado.

En cada una de las granjas, incluyendo las de Aragón, se tomaron muestras de los tanques de almacenamiento de leche tras el ordeño. En los tanques se reduce la temperatura de la leche por debajo de los 4 °C para evitar el desarrollo de la microflora presente en la leche cruda. De esta forma es posible almacenar la leche hasta 72 horas antes de que sea sometida a un tratamiento térmico. En los tanques se encuentra la leche de todas las vacas ordeñadas entre las 24 y 48 horas anteriores a la toma de muestras, por ello se consideraron muestras representativas de la granja.

Las muestras fueron codificadas para facilitar su manejo de la siguiente forma:

ABREVIATURA DE LA GRANJA\_INICIAL GRUPO AL QUE PERTENECE\_Nº DE ANIMAL

En la Tabla 2 se presentan las abreviaturas para la identificación de las muestras. Las iniciales del grupo se corresponden con: S, animales sanos, P, animales patológicos y T, tanque de leche.

Durante la realización del muestreo se recogió información de la explotación y de los animales, relevante para la discusión de los resultados. Esa información consistió en:

- De cada granja:
  - Localización
  - Alimentación de los animales
  - Tamaño de la granja (número de cabezas de ganado)
  - Puntuación o calificación Welfare Quality<sup>®</sup> de la última auditoría

- De cada animal:
  - Número de crotal de registro interno de la granja
  - Edad (años/meses)
  - Número de lactaciones
  - Patología (en el caso de animales enfermos)
  - Otras observaciones

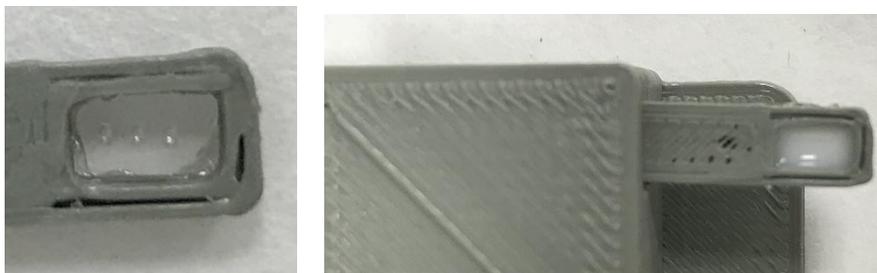
Los datos de las granjas que se obtuvieron en las granjas se presentan en el Anexo I. Los datos de animales individuales no son publicados debido a su amplio volumen.

En el momento del procesado, las muestras se descongelaron a temperatura ambiente para evitar daños térmicos en la haptoglobina y la coagulación de los glóbulos grasos. Una vez se encontraron en estado líquido las muestras, se procedió a realizar una homogeneización a través de una agitación mecánica ligera.

## 5.2. Detección de haptoglobina

La detección de haptoglobina se realizó mediante un inmunoensayo tipo sándwich desarrollado por la empresa IMG Pharma. Esta técnica consiste en la detección de haptoglobina a través de la unión específica de esta a dos anticuerpos en dos epítops diferentes de la proteína.

El anticuerpo primario se encuentra impreso sobre una superficie sólida sobre la que tiene lugar la incubación de la leche sin tratamiento previo (ver Figura 5).

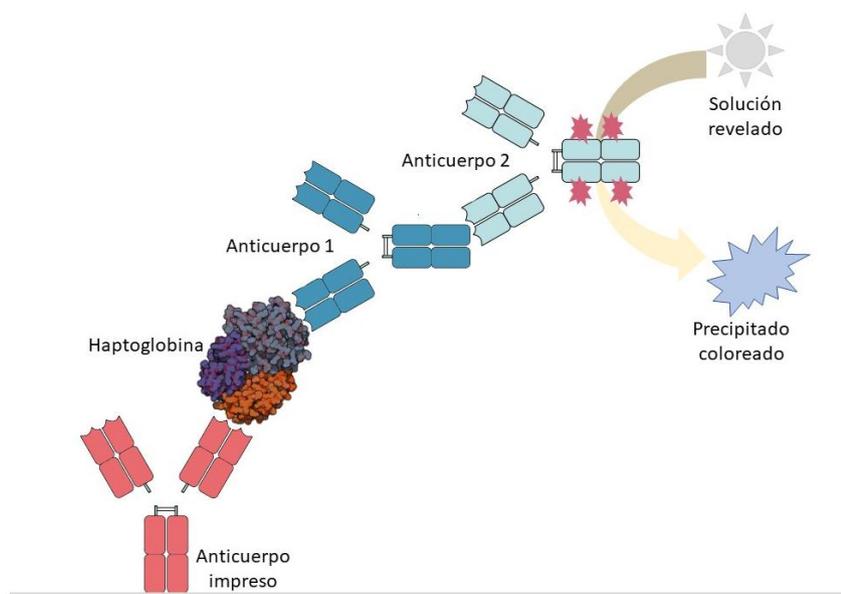


**Figura 5.** A la izquierda, detalle de los puntos en los que se encuentra inmovilizado el anticuerpo primario sobre una superficie transparente que permite la visualización del color si se genera.

A la derecha, incubación de la leche sobre la ventana en la que se encuentra impreso el anticuerpo primario en soporte que incluye el kit.

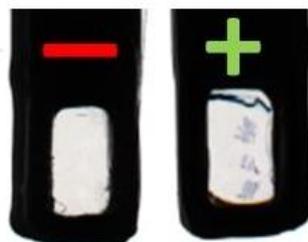
Posteriormente se lava en una solución salina para retirar la leche y se incuba de nuevo con la mezcla de anticuerpos. La segunda solución de incubación se habrá preparado previamente y en ella se produce la unión de los dos anticuerpos que permiten la generación de un precipitado coloreado observable a simple vista: el anticuerpo 1 anti-haptoglobina y el anticuerpo 2 anti-anticuerpo 1. El anticuerpo 2 es el que tiene una molécula ligada a la cadena pesada que reacciona con la solución de revelado generando un precipitado de color azul proporcional a la cantidad de proteína que ha quedado retenida por el anticuerpo impreso.

Tras la incubación de la mezcla de anticuerpos se realiza otro lavado en una solución salina para retirar por completo los anticuerpos que no hayan quedado retenidos por la unión a la haptoglobina, y que puedan generar una señal inespecífica. Por último, se realiza una última incubación con la solución de revelado que provocará la generación del precipitado de color azul que se considerará un resultado positivo.



**Figura 6.** Esquema de la detección de haptoglobina mediante el sistema de inmunoensayo desarrollado *in house* en IMG Pharma para su utilización en leche fresca.

La prueba se considerará positiva cuando se puedan observar los tres puntos en los que se han impreso los anticuerpos coloreados de azul y pueda visualizarse a simple vista, normalmente siendo más cómoda su observación sobre un fondo de color claro. Los resultados se han escaneado para poder comparar la coloración en las mismas condiciones, sobre el mismo fondo y en un momento relativo idéntico: justo después de la realización de la prueba.



**Figura 7.** Resultado de la prueba: a la izquierda negativo y a la derecha

Las muestras utilizadas para la determinación de las condiciones óptimas y para establecer el umbral de detección fueron controles positivos y negativos de haptoglobina en leche propiedad de IMG Pharma que sufrieron el mismo tratamiento que las muestras de leche que se tomaron para este proyecto. La concentración de estas muestras ya había sido determinada anteriormente mediante ELISA (de sus siglas en inglés *Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*) (ver Anexo II) y se presentan en la Tabla 3.

Muestra	$\mu\text{g/mL}$
1 Verde	14,71
2 Verde	2,19
3 Verde	89,2
1 Azul	1,81
2 Azul	0,37
3 Azul	56,4
1 Roja	252,0
2 Roja	225,6
3 Roja	48,2
Control	2,86
Mastitis	0,67

**Tabla 3.** Muestras control de concentración conocida para la determinación de los parámetros óptimos de la prueba.

Las variables que pueden modificarse para ajustar el umbral de detección son: la cantidad de anticuerpo inmovilizado, la concentración de la mezcla de anticuerpos y el tiempo de cada una de las incubaciones.

### 5.3. Espectrometría de masas MALDI-TOF

La espectrometría de masas es una de las herramientas más potentes para el estudio de biomoléculas, especialmente desde que se aplican técnicas de ionización blandas como MALDI (de sus siglas en inglés *Matrix-assisted laser desorption/ionization*). Mediante esta técnica la muestra queda retenida en una estructura cristalina, la matriz, que es irradiada con un láser para lograr la ionización de las biomoléculas cocrystalizadas junto

a ella, sin fragmentar la molécula. La energía que el láser transfiere a la muestra genera una pluma de ablación de estos cocristales y forma una nube de iones que es acelerada por un campo eléctrico hacia el analizador de masas, y posteriormente dirigida al detector. El tubo de vuelo es un tipo de analizador que permite conocer la relación masa/carga ( $m/z$ ) experimental de los iones mediante el cálculo del tiempo de vuelo, TOF (de sus siglas en inglés *Time Of Flight*). El tiempo de vuelo será mayor tanto mayor sea el valor  $m/z$  del ion que atraviesa el tubo (Jurinke, Oeth y van den Boom, 2004).

En este estudio se siguió la estrategia “shotgun” para la aplicación de la espectrometría en el campo de la lipidómica. En esta estrategia el espectro de masas conforma una huella dactilar lipídica de la muestra analizada, en la que las especies moleculares individuales de la mayoría de las clases de lípidos principales y muchas minoritarias pueden cuantificarse directamente sin necesidad de purificación cromatográfica. Esta estrategia es rápida, altamente sensible y puede identificar cientos de lípidos omitidos por otros métodos empleando menores cantidades de muestra, resulta muy útil para determinar en primer lugar diferencias en la composición lipídica de las muestras antes de identificar las especies responsables de estos cambios (Schwudke et al., 2011). El objetivo al aplicar esta técnica fue observar diferencias en los perfiles lipídicos de las diferentes muestras analizadas y valorar las similitudes aplicando diferentes criterios para su agrupación.

Se utilizó 2-mercaptobenzotiazol (MBT) como matriz para la ionización en modo positivo, siendo esta una matriz idónea para la detección de lípidos que favorece su ionización y presentando una alta estabilidad en condiciones de alto vacío, un requisito imprescindible para la espectrometría de masas (Astigarraga et al., 2009).

La matriz se preparó en saturación en un tampón (desarrollo propio de IMG Pharma) que permite la cocrystalización y la ionización óptimas. La muestra se diluyó en la disolución de matriz 1:5 v/v (muestra/matriz) realizando una homogeneización suave para posteriormente ser depositada en la placa conductora para el análisis en el espectrómetro. De la disolución muestra/matriz se depositó un volumen de 2  $\mu$ L, permitiendo la cristalización por evaporación a temperatura ambiente. Cada muestra se analizó por duplicado incluyéndose como blanco una disolución matriz para poder eliminar las interferencias debidas a su ionización.

El análisis se realizó en un espectrómetro de masas modelo Autoflex III (Bruker, Billerica, MA, EE. UU.). Este equipo dispone de un láser de estado sólido, que emite en

ultravioleta, a 355 nm. Se realizó una media de 3000 disparos por espectro evitando los depósitos de caseínas y proteínas que impedían la formación de cristales. Los espectros se adquirieron en el intervalo de  $m/z$  de 600 a 2000 Da, la zona en la que se espera encontrar lípidos, ya que por debajo se producen interferencias de matriz y por encima se habría superado el peso molecular de las especies que se esperaba encontrar. El equipo dispone de un tubo de vuelo como analizador de masas, junto con una placa multicanal (MCP) como detector de iones.

#### 5.4. Procesado de espectros

Todos los datos generados en el espectrómetro de masas se procesaron a través de diferentes aplicaciones informáticas desarrolladas por IMG Pharma empleando como lenguaje principal de programación Matlab (MathWorks, Natick, MA, EE. UU.). Previo procesado de los datos, todos los espectros generados fueron exportados de los archivos generados por el espectrómetro y transformados en un formato (.txt) con el que es posible trabajar los datos en dichas aplicaciones.

Una vez exportados los datos a formato .txt se procedió a su preprocesamiento con las siguientes etapas:

- Corrección de línea base a fin de determinar adecuadamente la intensidad de los picos.
- Alineado de todos los espectros por el método de correlación al espectro promedio.
- Suavizado mediante el algoritmo de Savitzky-Golay para eliminación del ruido.
- Normalización a corriente iónica total.
- Selección de picos con razón S/N (señal/ruido) superior a 3.

Los picos seleccionados fueron asignados por búsqueda en base de datos mediante un algoritmo propiedad de IMG Pharma a fin de determinar la especie lipídica correspondiente a cada  $m/z$ , teniendo en cuenta las diferentes ionizaciones que sufren estas. Sin embargo, para realizar una identificación más certera sería necesario realizar una espectrometría de masas en tándem o una cromatografía líquida.

A lo largo del presente trabajo se hará referencia a los lípidos identificados como  $mz(n)$ , siendo (n) un número natural asignado de manera ordinal en función del valor de  $m/z$ , considerando  $mz1$  para el menor y  $mz248$  para el mayor, sin consignar su  $m/z$  ni su

asignación, en virtud del acuerdo de confidencialidad suscrito con la empresa IMG Pharma a fin de proteger la propiedad industrial presente y futura.

## **5.5. Análisis estadístico**

Los diferentes análisis estadísticos se realizaron utilizando los paquetes informáticos SPSS 26.0 (IBM, Endicott, NY, EE. UU), Orange Biolab (Universidad de Liubliana) y Matlab.

### **5.5.1. Prueba F de Fisher**

Se utilizó para evaluar la homogeneidad de las varianzas de dos grupos independientes, los animales clasificados como sanos y patológicos, y los que resultaron positivos en la prueba de detección haptoglobina en leche frente a los negativos. Permitted validar la posibilidad de que pudieran compararse y considerarse diferencias significativas utilizando la prueba t de Student con intervalo de confianza del 95%.

### **5.5.2. T-test**

Esta prueba se utilizó para identificar los picos que presentan diferencias significativas entre las medias de dos grupos independientes: sanos y patológicos en primer lugar, y positivos y negativos al test de detección de haptoglobina en leche en segundo lugar, tras haber comprobado la homogeneidad de las varianzas con la prueba F. El nivel de confianza utilizado fue del 95%.

### **5.5.3. Prueba de Levene**

Permite valorar la homocedasticidad (homogeneidad de la varianza) cuando se analizan más de dos grupos (en este caso, las granjas de origen de las muestras de leche). La prueba de Levene se empleó para evaluar la hipótesis de que las varianzas de muestras independientes son semejantes y su resultado permitió validar la posibilidad de que pudieran compararse y considerarse diferencias significativas utilizando el test ANOVA de un factor, con un nivel de confianza del 95%.

### **5.5.4. Test ANOVA de un factor**

Se realizaron análisis de la varianza de un factor en el caso en el que se disponía de más de dos grupos (la identificación de los picos más relevantes para discernir entre las granjas de origen de las muestras). El ANOVA de un factor permite identificar el efecto de una variable sobre las medias de poblaciones independientes, por lo que fue la herramienta

utilizada para seleccionar los canales másicos que más peso tenían en la separación de individuos en función de su origen. El nivel de confianza establecido fue del 95%

### **5.5.5. Coeficiente de correlación de Pearson**

Es una prueba de asociación que refleja la correlación o asociación entre dos variables sin establecer una relación de causalidad. Las correlaciones lineales pueden ser positivas o negativas, describiendo una relación directa o inversa entre variables. La magnitud de la correlación establece la intensidad de la asociación, teniéndose en cuenta habitualmente los siguientes rangos aproximados:

- 0 – 0,3: no hay asociación lineal.
- 0,3 – 0,5: asociación baja.
- 0,5 – 0,7: asociación moderada.
- 0,7 – 1: correlación alta.

Esta medida se utilizó para valorar la correlación entre los tanques de leche de las granjas y las respectivas muestras de animales individuales clasificadas en base a su condición de animal diagnosticado o animal sano.

### **5.5.6. Análisis de componentes principales (PCA)**

El PCA es un método estadístico que permite reducir la dimensionalidad (número de variables) de un conjunto de datos, describiéndolo en términos de nuevas variables (componentes) no correlacionadas que se ordenan por la cantidad de varianza original que describen. Esto permite describir el conjunto de datos original en términos de dos o tres variables (las componentes principales), facilitando su visualización y el establecimiento de clústeres en los datos y de relaciones entre las variables originales.

## 6. Resultados y discusión

### 6.1. Determinación de las condiciones óptimas para la detección de haptoglobina

La detección de haptoglobina en leche se realizó mediante inmunoensayo desarrollado por IMG Pharma cuyas características permiten la adaptación a múltiples condiciones ajustando diferentes parámetros. El objetivo fue conseguir un umbral de detección de 2  $\mu\text{g/mL}$ , puesto que es la concentración a partir de la cual se considera que la haptoglobina en leche es consecuencia de estrés o de un proceso clínico, según diferentes investigadores como González, Martínez-Subiela y Cerón o Hiss et al. en 2007.

Las condiciones iniciales para la realización de las pruebas fueron las representadas en la Tabla 4.

Cantidad anticuerpo impreso	Concentración Anticuerpo 1 (v/v)	Concentración Anticuerpo 2 (v/v)	t incubación leche y mezcla anticuerpos (min)	t incubación solución de revelado (min)
10 gotas/punto	1:400	1:400	2	2

**Tabla 4.** Condiciones iniciales para la detección de haptoglobina en leche en el kit de IMG Pharma.

En la primera prueba de las tiras en las que se realizaron los inmunoensayos se utilizó un control positivo, la muestra 3 Verde de los controles internos, que presentaba una concentración de 89,2  $\mu\text{g/mL}$ . Se obtuvo una señal positiva de intensidad muy baja, por lo que, al tratarse de una muestra de concentración alta, respecto al umbral deseado, se decidió aumentar los tiempos de incubación. Se incrementaron a 6 minutos los tiempos de incubación tanto de la leche como de la mezcla de anticuerpos y a 5 el tiempo de incubación de la solución de revelado. Además, se incluyó en la prueba la muestra ILR\_P\_2, perteneciente a un animal que se encontraba sufriendo, por tanto, en una fase aguda causada por una cojera reciente que no había sido tratada. Los resultados obtenidos, mostrados en la Figura 8, fueron positivos, pero con una intensidad baja, el color azul generado era muy tenue.



**Figura 8.** Imagen escaneada de los resultados del segundo ensayo con resultados positivos para las dos muestras (3 Verde control de 89,2  $\mu\text{g/mL}$  y muestra problema ILR\_P\_2)

Se trató de determinar la concentración umbral a partir de la que se obtenía un resultado positivo utilizando varias muestras control de concentración decreciente: 1 Rojo, 1 Verde y 2 Azul, siguiendo las condiciones de incubación con el tiempo ampliado. El resultado fue un único positivo, el de la muestra 1 Rojo, de concentración 25,2  $\mu\text{g/mL}$ . También se observó un cerco de humedad en las tiras, por lo que se barajó que la complejidad de la muestra pudiera dificultar la interacción entre anticuerpos y proteínas.

Se trató de reducir el umbral de detección aumentando de nuevo los tiempos de incubación de la leche y de la mezcla de anticuerpos, alcanzando los 10 minutos. Para valorar las posibles interferencias del resto de componentes de la leche, se intentó identificar el umbral de detección a través de tres diluciones al 50% en volumen en tampón fosfato salino o PBS (de sus siglas en inglés *Phosphate Buffered Saline*) de la muestra 1 Verde. Las condiciones en las que se desarrollaron estos ensayos vienen detalladas en la Tabla 5.

Cantidad anticuerpo impreso	Concentración Anticuerpo 1 (v/v)	Concentración Anticuerpo 2 (v/v)	t incubación leche y mezcla anticuerpos (min)	t incubación solución de revelado (min)
10 gotas/punto	1:400	1:400	10	5

**Tabla 5.** Condiciones para la detección de haptoglobina en leche en el kit de IMG Pharma en el tercer ensayo.

El resultado obtenido fue una coloración tenue en la concentración más elevada, de 14,7  $\mu\text{g/mL}$ , sin embargo, el aumento de los tiempos de incubación no fue suficiente para reducir el umbral de detección.

Manteniendo estas condiciones se aumentó el rango de las concentraciones sustituyendo la muestra inicial por una de mayor concentración en haptoglobina, la muestra 3 Rojo, con 48,2  $\mu\text{g/mL}$ . Se realizaron cinco diluciones seriadas, pero de nuevo se observó únicamente un resultado positivo, aunque de intensidad muy débil, en la primera dilución y en la muestra completa.

Debido a ello, se aumentó la concentración de los dos anticuerpos que componen la mezcla, el anticuerpo 1 específico anti-haptoglobina y el anticuerpo 2 anti-anticuerpo 1 marcado para generar la señal colorimétrica, preparando una nueva solución con una proporción de 1:200 v/v (anticuerpo/solvente). En estas condiciones (Tabla 6), se realizaron las mismas pruebas para las series de diluciones de las muestras 1 Verde y 3 Rojo.

Cantidad anticuerpo impreso	Concentración Anticuerpo 1 (v/v)	Concentración Anticuerpo 2 (v/v)	t incubación leche y mezcla anticuerpos (min)	t incubación solución de revelado (min)
10 gotas/punto	1:200	1:200	10	5

**Tabla 6.** Condiciones para la detección de haptoglobina en leche en el kit de IMG Pharma para la calibración en las series de diluciones de la muestra 1 Verde y 3 Rojo.

Se obtuvieron resultados positivos en las muestras sin diluir, pero no en aquellas de concentración más baja. Dado que no se observó una reducción del umbral de detección, se optó por incrementar la cantidad de anticuerpo impreso, manteniendo el resto de condiciones (Tabla 7).

Cantidad anticuerpo impreso	Proporción Anticuerpo 1	Proporción Anticuerpo 2	t incubación leche/mezcla anticuerpos (min)	t incubación solución de revelado (min)
50 gotas/punto	1:200	1:200	10	5

**Tabla 7.** Condiciones para la detección de haptoglobina en leche en el kit de IMG Pharma en para la calibración en las series de diluciones de la muestra 1 Verde.

La primera prueba se realizó con la serie de diluciones de la muestra 1 Verde, dado que se esperaba un umbral de detección más bajo que en los ensayos anteriores. Los resultados obtenidos, mostrados en la Figura 9 a la izquierda, fueron positivos para todas las concentraciones, incluso en la de 1,75  $\mu\text{g/mL}$ .

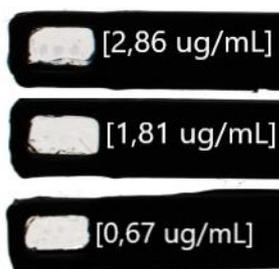


**Figura 9.** Imágenes escaneadas de los resultados de los inmunoensayos para las diluciones de la muestra 1 Verde. A la izquierda, con incubación de 10 minutos para la leche y la mezcla de anticuerpos y 5 minutos para la de la solución de revelado. A la derecha, con todas las incubaciones de 2 minutos.

Al observarse una intensidad alta de la respuesta y en todas las concentraciones, incluso en la más baja que resultó un positivo de gran intensidad, se decidió acortar los tiempos de incubación a 2 minutos en cada uno de los pasos. El resultado obtenido se muestra en la Figura 9 en el lado derecho. Se obtuvo un resultado positivo en todos los casos de nuevo, con una señal más débil.

Para valorar una posible unión inespecífica a los puntos en los que está impreso el anticuerpo se prepararon dos ensayos adicionales: uno con una muestra control de leche de concentración próxima a cero, el control Mamitis y concentración de 0,67  $\mu\text{g/mL}$ , y un blanco con utilizando PBS en lugar de leche. Sendos resultados fueron negativos descartando esta posibilidad situando el umbral de detección por encima de los 0,67  $\mu\text{g/mL}$  y por debajo de los 1,75  $\mu\text{g/mL}$ .

En base a ello, se trató de establecer la concentración umbral en 2  $\mu\text{g/mL}$  a través de la dilución de la mezcla de anticuerpos 1 y 2. Se prepararon tres diluciones a partir de la preparación de 1:200 v/v con el solvente, es decir: 1:400 (v/v), 1:800 (v/v) y 1:1600 (v/v). Tratando de ajustar mejor la concentración se realizaron estos ensayos con las muestras Control Amarillo (concentración de haptoglobina 2,86  $\mu\text{g/mL}$ ), 1 Azul (concentración 1,81  $\mu\text{g/mL}$ ) y Control Mastitis (concentración 0,67  $\mu\text{g/mL}$ ). Los resultados observados mostraron que la concentración de la mezcla de anticuerpos que establecía la concentración umbral de detección alrededor de los 2  $\mu\text{g/mL}$  fue la de proporción 1:800. El salto entre negativo y positivo se observa entre las muestras 1 Azul, que fue negativa, y la muestra Control Amarillo, que fue positiva (ver Figura 10).



**Figura 10.** Imágenes escaneadas de las tiras para el inmunoensayo de muestras con concentraciones bajas de haptoglobina.

Debido a estos resultados se determinaron las mejores condiciones para determinar las muestras de leche que presentaban una concentración por encima de los 2  $\mu\text{g/mL}$  de haptoglobina, y por tanto se encontraban en el curso de una fase aguda. Estas condiciones, expuestas en la Tabla 8, se aplicaron a todas las muestras.

Cantidad anticuerpo impreso	Concentración Anticuerpo 1 (v/v)	Concentración Anticuerpo 2 (v/v)	t incubación leche y mezcla anticuerpos (min)	t incubación solución de revelado (min)
50 gotas/punto	1:800	1:800	2	2

**Tabla 8.** Condiciones óptimas para la detección de haptoglobina en leche por encima de los 2  $\mu\text{g/mL}$  mediante el kit de desarrollo interno de IMG Pharma.

## 6.2. Estimación de la prevalencia de cursos subclínicos en animales no diagnosticados y de cursos agudos en animales diagnosticados

Los resultados obtenidos en las pruebas para la detección de haptoglobina realizadas en las muestras de animales individuales se muestran en la Tabla 9.

Granja	Tipo animal	Muestra	Resultado HaptoKit	Prevalencia en la muestra	
MAR	S	1	-	40%	
		2	+		
		3	-		
		4	+		
		5	-		
	P	1	+	33,3%	
		2	-		
		3	-		
VTR	S	1	-	0%	
		2	-		
		3	-		
		4	-		
		5	-		
	P	1	+	100%	
	MCH	S	1	-	20%
			2	-	
3			-		
4			-		
5			+		
P		1	+	50%	
		2	-		
FTR		S	1	-	40%
	2		-		
	3		-		
	4		+		
	5		+		
	P	1	+	75%	
		2	-		
		3	+		
4		+			
ILR	S	1	-	20%	
		2	+		
		3	-		
		4	-		
		5	-		
	P	1	-	25%	
		2	+		
		3	-		
4		-			

**Tabla 9.** Resultados de las muestras individuales para la detección de haptoglobina por encima de los 2 µg/mL con el sistema de IMG Pharma.

Las muestras en las que se obtuvo un resultado positivo, es decir se observó color azul en los puntos de las tiras del kit, se marcaron con el símbolo “+” y con sombreado verde en la Tabla 9. Estos resultados mostraron la presencia de animales con haptoglobina por encima de 2  $\mu\text{g/mL}$  en leche en todas las granjas en las que se tomaron muestras de animales individuales. Se observó una mayor prevalencia en los animales patológicos en el conjunto de todas las granjas, al ser positivos el 50% (7/14), lo que significa que, **a pesar de ser animales en los que se ha identificado una enfermedad o lesión, se encuentran en fase aguda consecuencia del mismo proceso o del estrés causado por el tratamiento o de otro agente externo.**

Por otro lado, en el conjunto de animales sanos de todas las granjas resultaron positivos el 24% (6/25), una cifra que llama la atención al ser indicativo de estrés agudo o patología subclínica. Sin embargo, una de las razones que pueden explicar el resultado es el momento en el que se tomaron las muestras. Todas las extracciones de las muestras se tomaron durante la estación estival, con temperaturas máximas superiores a los 40 °C en los alrededores del Valle del Ebro. Diferentes autores como Herbut, Angrecka y Walczak, indicaron en 2018 que el ganado vacuno es muy sensible a las condiciones climáticas, especialmente a la temperatura y a la humedad. Las altas temperaturas causan estrés térmico en los animales, que cuando se prolonga a lo largo del tiempo tiene efectos fisiológicos e incluso síntomas clínicos observables a simple vista. **Por tanto, cabe esperar que una de las razones por las que se encuentren niveles de haptoglobina elevados en un porcentaje importante de los animales sanos sea el estrés térmico al que estaban sometidos los animales durante las fechas en las que se realizaron los muestreos.** La validación de esta hipótesis se llevaría a cabo realizando muestreos durante otras épocas del año, ya que se trata de un factor estacional.

Otra hipótesis que justifique los resultados obtenidos es que los animales clasificados como sanos se encontraran sufriendo una patología subclínica sin sintomatología aparente bien por tratarse de las primeras fases o por tratarse de un curso subclínico. A pesar de no contar con registros oficiales ni estudios en España de la prevalencia de enfermedades o lesiones en las granjas de vacuno lechero, son orientativos los estudios realizados en otros países. En Finlandia, pese a un descenso de la prevalencia de la mastitis subclínica sostenido a lo largo de las últimas décadas, todavía se encuentra en un 19% (Hiitiö et al., 2017). Por ello, es probable que cierto porcentaje de los animales con resultado positivo de haptoglobina en leche, se encuentre en un proceso subclínico.

La determinación con el inmunoensayo de IMG Pharma, permite realizar los análisis de varios animales simultáneamente de manera sencilla, facilitando el testado de un mayor número de animales y además su aplicación *in situ*, obteniendo información más precisa de los animales de una granja y de la situación global de esta. La información obtenida mediante estos análisis puede resultar de gran utilidad para los ganaderos y apoyar la toma de decisiones en el manejo de los animales.

Además, para obtener información complementaria de las granjas, se realizó la detección de haptoglobina en los tanques de leche de las granjas en las que se tomaron muestras de animales individuales y en las que no.

Granja	Resultado HaptoKit (Tanque)
MAR	-
VTR	-
MCH	-
FTR	+
ILR	-
ALF	+
MNT	-
MRB	-
MVR	-

**Tabla 10.** Resultados de la detección de haptoglobina en las muestras de tanques de leche.

Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 10. Se obtuvieron dos resultados positivos en los tanques de leche, lo que resultó de gran interés dada la alta capacidad de los tanques, es decir, que para alcanzar la concentración umbral, fue necesaria la contribución de un número razonablemente alto de animales con haptoglobina en leche.

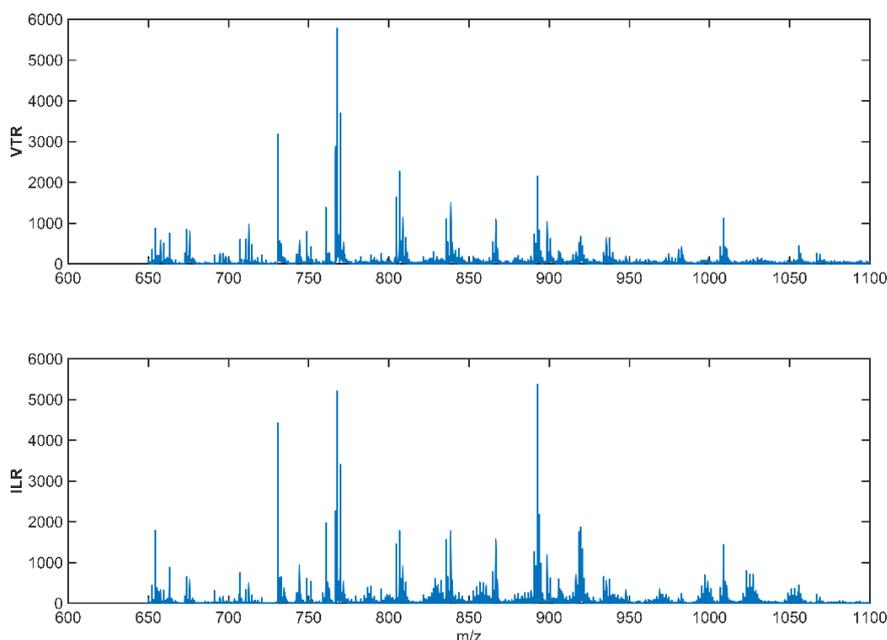
El caso de la granja FTR, se trata de una granja que obtuvo la calificación “Bueno” en la última auditoría Welfare Quality (ver Anexo I). Sin embargo, en el momento del muestreo, sufría problemas de mastitis graves con varias vacas enfermas (cuya leche no se recoge en el tanque) y numerosos animales que habían superado las infecciones recientemente. Por tanto, es posible que entre el rebaño se encuentren animales en una fase inicial del desarrollo de una mamitis consecuencia de la transmisibilidad entre animales que comparten instalaciones y generen una concentración de haptoglobina en tanque indicativa de estrés o patología.

Por otro lado, la granja ALF es una explotación con un censo de 70 animales, lo que provoca que un menor número de animales con haptoglobina en leche repercuta en un aumento en la mezcla de toda la explotación. El peso de la aportación de cada individuo es mayor en un rebaño más pequeño.

Estos resultados incitan a realizar estudios acerca de la detección de haptoglobina en tanque con el objetivo de valorar en qué condiciones se podría utilizar como indicador de bienestar o de estado global de las granjas.

### 6.3. Obtención de los perfiles lipídicos e identificación de posibles marcadores

Los perfiles lipídicos de las muestras de leche se obtuvieron mediante la espectrometría de masas. Se realizaron dos espectros de cada muestra, tanto de la leche procedente de animales individuales como aquellas que se extrajeron del tanque de almacenamiento. Posteriormente, los espectros generados se normalizaron, suavizaron y alinearon entre ellos, generando espectros como los de la Figura 11.



**Figura 11.** Espectros normalizados, con la línea base corregida suavizados y alineados de dos muestras de tanque de leche: arriba muestra del tanque de Valtierra y debajo del de Ilarregui.

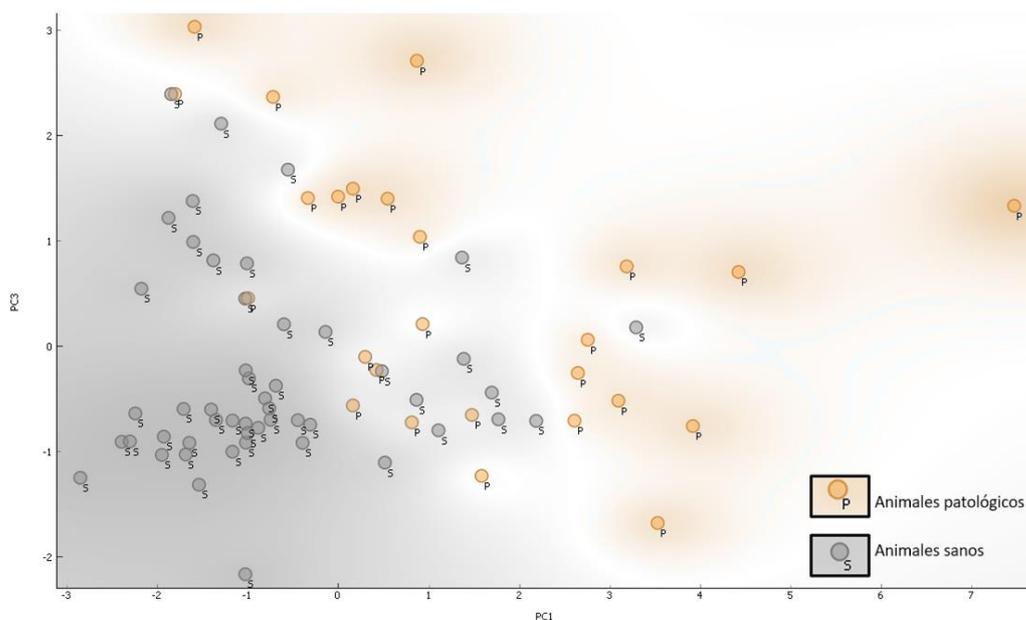
Gracias a este procesado de los datos, se identificaron 248 picos por encima del ruido de fondo y diferentes de las interferencias de la matriz. La razón señal/ruido en todos los picos que se cribaron siempre fue superior a 3. Los picos se asignaron de manera tentativa a las especies lipídicas que podrían presentar una ionización con la relación masa/carga detectada, identificándose especies de fosfatidilcolinas, fosfatidilserinas,

fosfatidilesterinas, esfingomiélinas y glicéridos. A pesar de ello, se trata de una identificación tentativa que en algunos casos requeriría de una confirmación por fragmentación o a través de otras técnicas.

### 6.3.1. Identificación de las diferencias en el perfil lipídico de la leche de vacas sanas y vacas patológicas: marcadores lipídicos de estado sanitario

Los 248 picos que se extrajeron de los espectros después de haber sido procesados se sometieron a un T-test tras haber validado la posibilidad de su aplicación a través de la prueba F. En este caso las muestras que se incluyeron en el análisis fueron las procedentes de animales individuales, tomando como variable independiente el estado fisiológico: animales sanos o patológicos. De esta forma, se localizaron los 10 picos que mayor relevancia tenían a la hora de separar los dos grupos, es decir, aquellos que generaban las diferencias más significativas.

Tomando estos 10 canales másicos como referencias, se realizó un PCA en el que se seleccionó la combinación de componentes más informativas (ver Figura 12). En ella se observa una distribución de las muestras separadas: en el cuadrante superior derecho se localiza la mayoría de las muestras de animales patológicos, mientras que la mayoría de los animales sanos se agrupan en el cuadrante inferior izquierdo. En la zona central se encuentra una mezcla heterogénea de las muestras que no permite obtener una diferencia clara entre individuos sanos y patológicos.

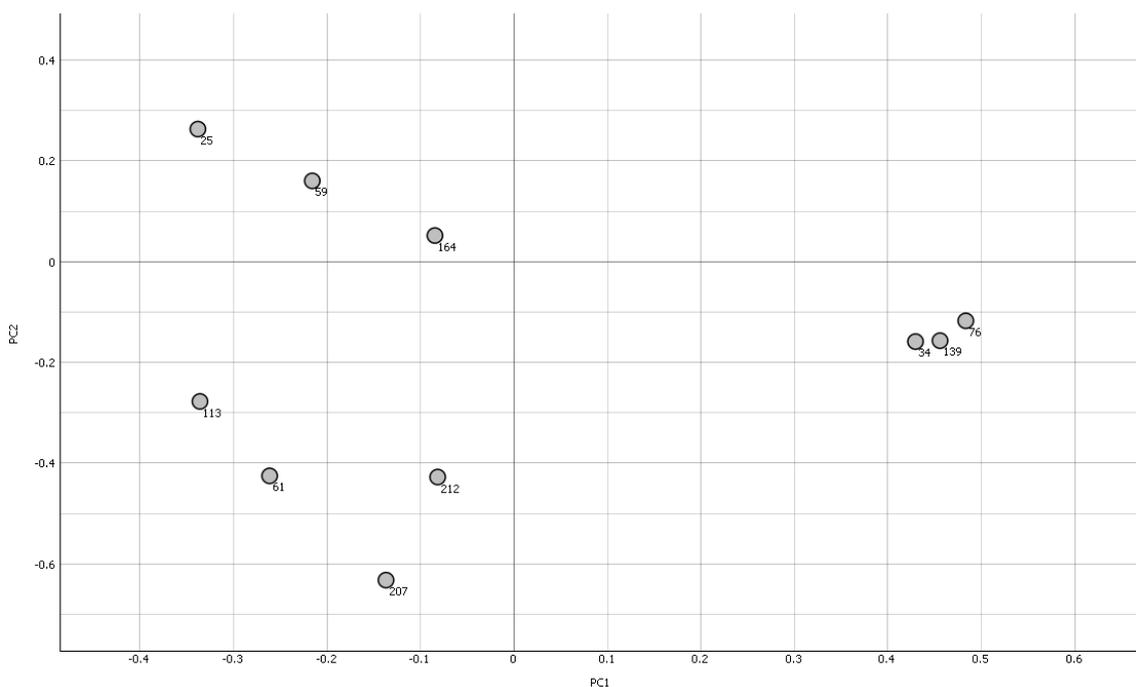


**Figura 12.** Proyección de las componentes más informativas del PCA de todas las muestras de leche procedentes de animales individuales clasificadas como animales sanos y animales patológicos.

A simple vista, es posible observar que la componente principal 1 es la más informativa a la hora de describir estos dos grupos. Esto mismo es corroborado en la proyección de las dos primeras componentes. En la Figura 13 se muestra esta proyección, situando los 10 picos utilizados para realización del PCA, en función de su carga para cada componente.

En ella destacan tres de los picos con una carga importante: mz34, mz76 y mz139. Estos tres picos presentan cargas de 0,5 en la componente principal 1, que resulta la más relevante para poder identificar los grupos.

Estas especies lipídicas son potenciales marcadores de enfermedad o patología en leche. Será necesaria una validación más robusta aumentando el número de muestras y valorando el perfil clínico de los animales, ya que, en este estudio, se han tomado animales patológicos, en su mayoría animales con mamitis, pero también con otras patologías.



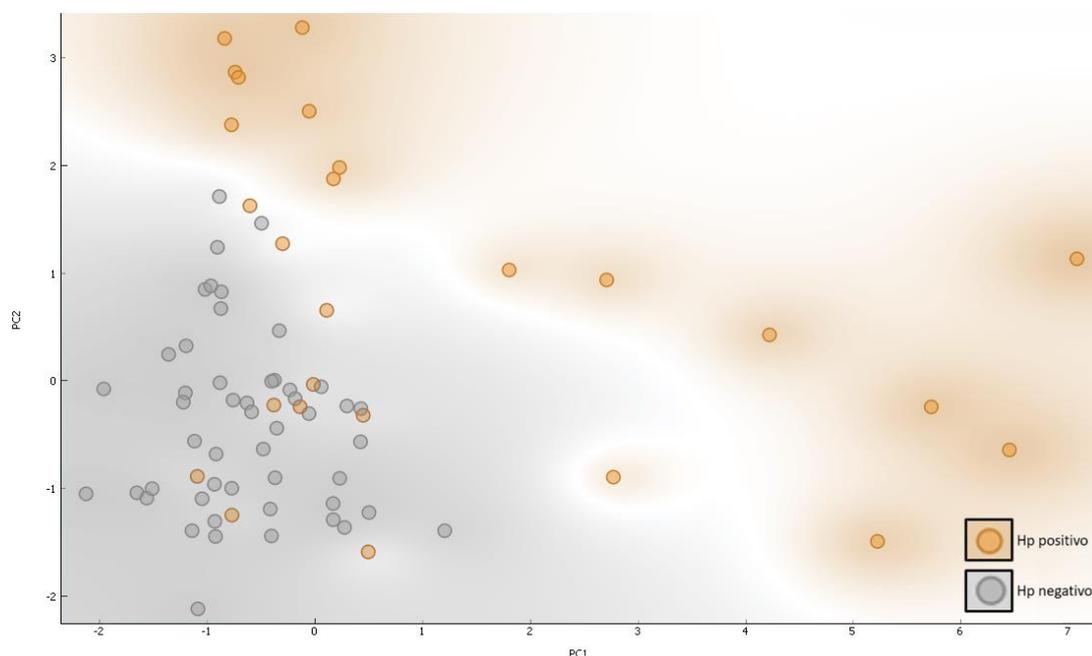
**Figura 13.** Proyección de los 10 picos más significativos para la distinción entre los grupos “Sanos” y “Patológicos” sobre las componentes principales 1 y 2 en función de la carga que ejercen.

Resultaría, así mismo de interés valorar las características individuales de las muestras que quedan distribuidas en la franja central, tanto sanos como patológicos. Las muestras clasificadas como patológicas que quedan situadas en esta franja central podrían pertenecer a animales en un estado de recuperación más avanzado que de aquellas que quedan agrupadas o con un cuadro clínico diferente. En esta misma línea, se barajó la

hipótesis de que las muestras sanas que no fue diferenciar de las patológicas sufran algún proceso patológico que no ha sido diagnosticado todavía.

### 6.3.2. Perfil lipídico de muestras de leche en función de su concentración de haptoglobina

Se realizó un nuevo PCA utilizando como variables los 10 picos más significativos con el objetivo de discriminar entre las muestras positivas en el test de haptoglobina y las negativas. Estos picos se seleccionaron en base al nivel de significancia como resultado de la prueba T de Student para esta agrupación de muestras. La distribución generada por el PCA se muestra en la Figura 14.

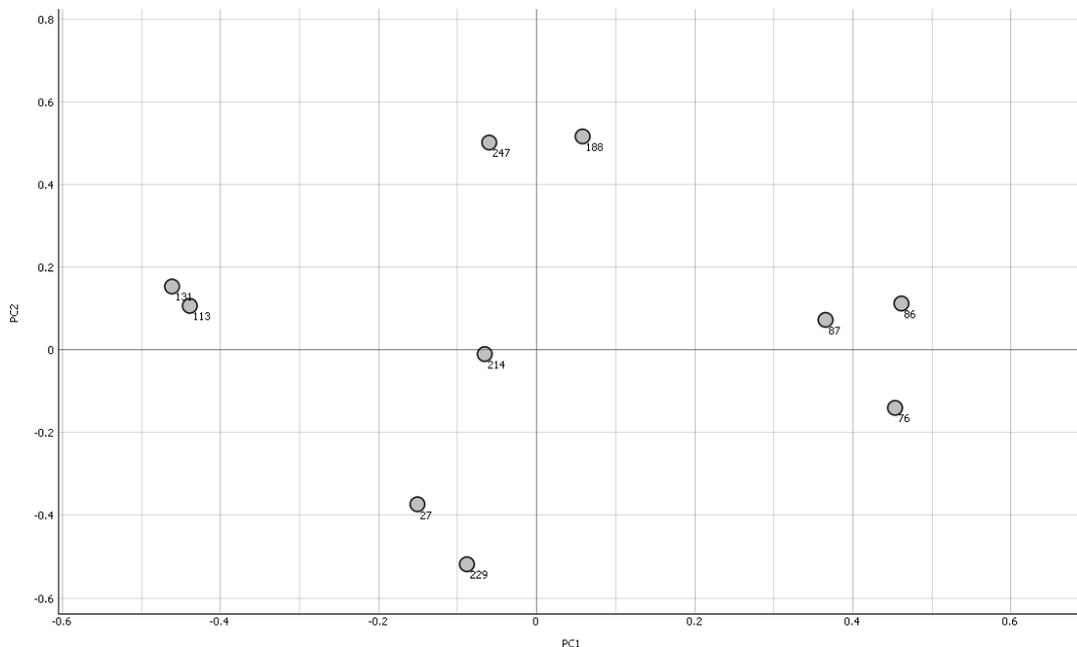


**Figura 14.** Proyección de las componentes principales 1 y 2, resultado del PCA para los grupos de muestras individuales en función del resultado del test de haptoglobina.

En este gráfico se observa una agrupación de los individuos que han resultado negativos para el test de haptoglobina en la región comprendida entre las coordenadas (-2,-2) y (2,2). En esta zona se encuentran todas las muestras que no presentan, o presentan menos de 2  $\mu\text{g/mL}$ , de haptoglobina en leche. Sin embargo, entre ellas también se encuentran muestras que han resultado positivas, a pesar de que la mayoría se localizan en valores más elevados de la componente 1.

En este caso, la proyección más informativa fue la de las componentes 1 y 2, pero al representar los picos responsables de esta proyección en base a la carga que aporta cada uno de ellos, se distinguen, al igual que en la agrupación según estado fisiológico, tres picos con un mayor peso a la hora de caracterizar las muestras que resultaron positivas a

la detección de haptoglobina. Se trata de los picos: mz76, mz86 y mz87 y puede observarse su situación en las componentes principales 1 y 2 en la Figura 15.



**Figura 15.** Proyección, sobre las componentes principales 1 y 2 del PCA de los 10 picos del espectro más significativo para discriminar entre los grupos positivo y negativo para el test de haptoglobina.

Entre ellos, el que genera un mayor interés es el pico mz76, puesto que **se trata de uno de los más relevantes a la hora de caracterizar las muestras de animales patológicos y, además, de las muestras que han sido haptoglobina positivas en una concentración superior a 2 µg/mL**. En caso de validarse, esta especie lipídica podría ser de gran interés como marcador de patología en vacuno de leche, permitiendo anticipar el diagnóstico al desarrollo de síntomas y permitiendo monitorizar la evolución de una enfermedad a través de un biomarcador. Resulta de gran interés en el ámbito de la producción láctea, dado que la posibilidad de acortar plazos y minimizar tratamientos produciría una disminución de las pérdidas económicas asociadas tal como propusieron Heikkilä et al. en 2018.

En el caso de las mastitis, la mayor parte de las pérdidas económicas se producen por los casos subclínicos (Huijps, Lam y Hogeveen, 2008). De manera, que disponer de herramientas que permitan identificar estas situaciones o estados de los animales, podría reducir estos costes mejorando la situación económica de los ganaderos y el bienestar de los animales. La toma de decisiones que deben tomar los ganaderos diariamente en el manejo de los animales es un factor de gran relevancia en la repercusión económica de los procesos patológicos (Halasa et al., 2007). Por tanto, la posibilidad de disponer de información que respalde y apoye la toma de decisiones, resulta de gran valor, ya que

podría aplicarse para reducir el periodo en el que el animal no es productivo, reducir el número de cursos de enfermedad que sufre cada animal y el tiempo de tratamiento en cada uno de ellos. Todo ello incurre en un efecto positivo para el bienestar de los animales.

### **6.3.3. Valoración del perfil lipídico de la leche de vacas sanas y patológicas en cada una de las granjas**

Utilizando los picos previamente identificados como los más significativos para caracterizar los grupos de animales sanos y patológicos, se realizaron PCA sobre las muestras individuales y de los tanques de cada una de ellas. De esta forma, se procuró eliminar la influencia de factores como la alimentación, las instalaciones o el manejo, dependientes de la ganadería a la que pertenece cada animal para valorar la capacidad para discriminar los individuos en diferentes estados patológicos con estas especies lipídicas. Además, en estas distribuciones se incluyeron las muestras de los tanques de cada granja, tratando de evaluar si el perfil lipídico de la mezcla del total de la leche destinada a consumo de la granja se asemeja más o menos al perfil lipídico de la leche de los animales sanos o al de los patológicos.

Se calculó la correlación de Pearson de las muestras de los tanques con las muestras, por un lado, sanas de la misma granja, y por otro, de las patológicas del mismo grupo. De manera que se obtuvo un valor de asociación a cada grupo de las muestras de los tanques, ofreciendo una información más precisa basada en su perfil lipídico.

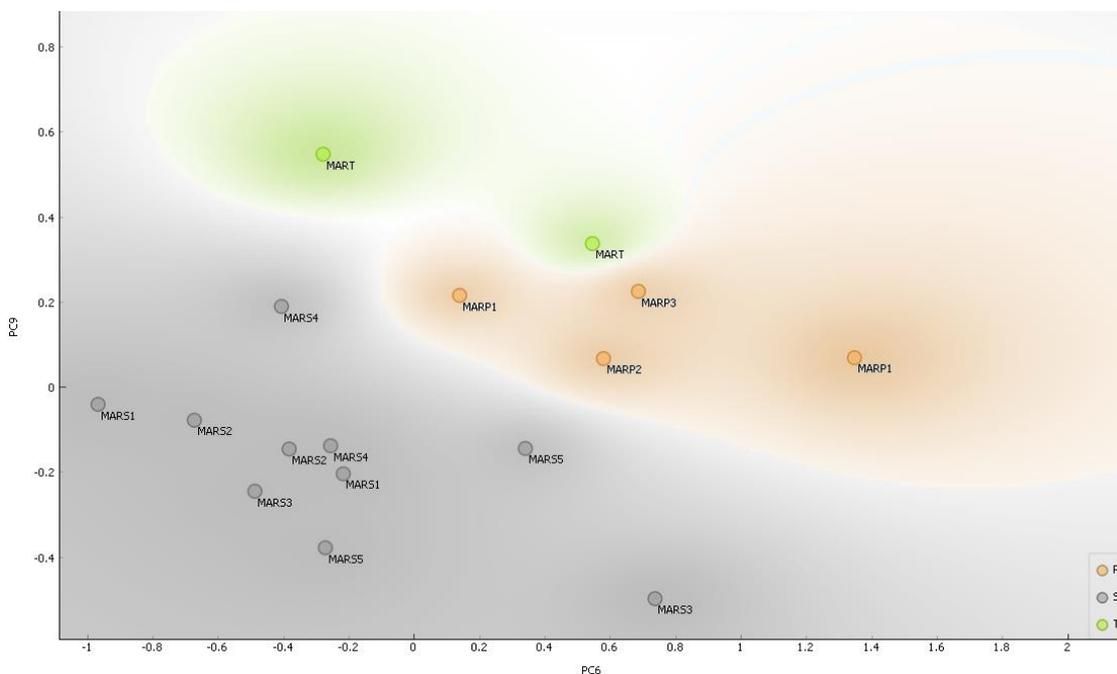
#### **6.3.3.1. Granja Marcilla**

La proyección de las componentes más informativas se muestra en la Figura 16. En este caso, las componentes más informativas fueron la 6 y la 9, permitiendo observar una separación evidente entre las muestras de animales patológicos y animales sanos. En esta se tomaron muestras de tres animales enfermos por mastitis, por lo que la proporcionalidad con los animales sanos muestreados (cinco) fue buena.

Las réplicas de la muestra del tanque de la granja se situaron en la parte superior de la proyección, entre la agrupación las muestras sanas y la de las muestras de animales patológicos, sin observarse una similitud clara con ninguno de los dos grupos. Las réplicas se encontraban próximas entre sí, pero de la misma manera se localizaban muestras sanas y patológicas con una dispersión similar.

La correlación obtenida de las muestras del tanque con las muestras sanas de 0,877 y para las patológicas de 0,833. Son valores muy similares y en ambos casos se trata de

asociaciones de alta intensidad. Si bien la asociación es mayor con las muestras de vacas sanas, no resulta determinante para la clasificación del tanque acorde a alguno de estos dos grupos.



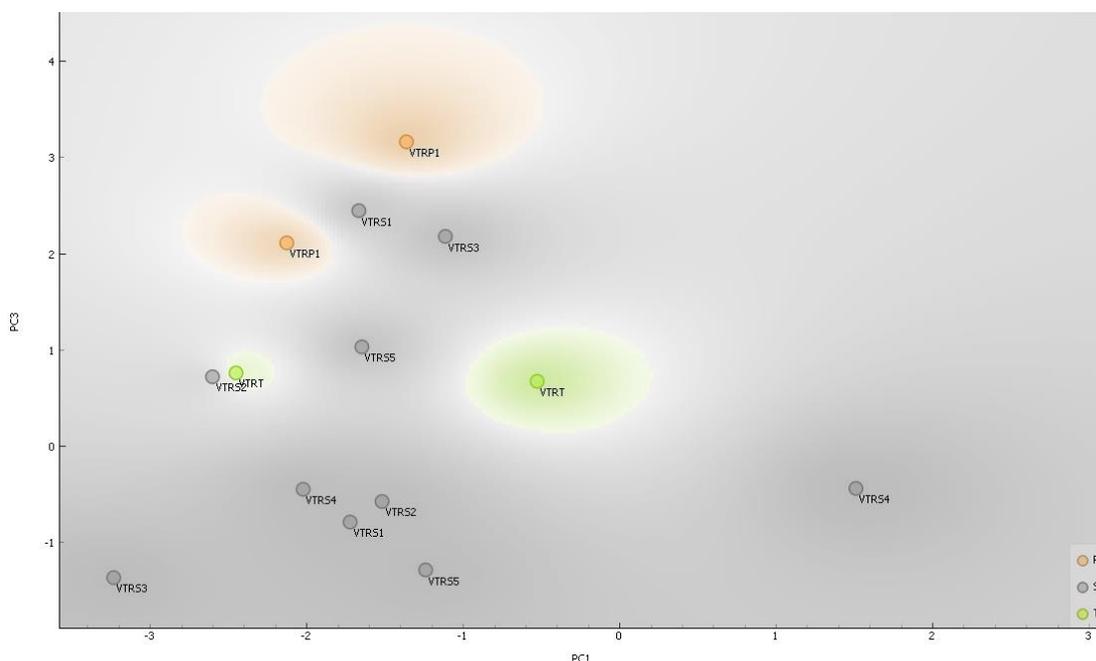
**Figura 16.** Proyección de las componentes más informativas del PCA del total de las muestras de la granja Marcilla.

Esta explotación no dispone de espacio para el esparcimiento de los animales, se trata de una granja de tamaño medio, con 90 cabezas. Es importante tener en cuenta que el muestreo de animales sanos, es decir que contribuyen al tanque, se corresponde con el 5,5% del censo de la explotación. Por ello, es posible que entre el resto de los animales que aportan leche al tanque puedan presentar patologías infradiagnosticadas o que pueda tratarse de una consecuencia del estrés térmico, debido a las condiciones climáticas de extremo calor que se dieron durante la toma de muestras. En la última auditoría obtuvo una cualificación de “Suficiente” según el protocolo Welafre Quality®. Es posible por tanto que los estímulos externos como el tipo de explotación o la alimentación más seca de lo que podrían obtener en su ámbito natural, contribuyan a que el perfil del tanque tenga similitudes importantes con el de animales patológicos.

### 6.3.3.2. Granja Valtierra

En esta explotación sólo fue posible tomar la muestra de un animal patológico, que además se encontraba en la fase final de un proceso de mastitis. Por ello, es lógico esperar una mayor similitud entre los resultados de los animales sanos con los del animal

patológico. Esto se observa en la Figura 17, en la proyección de las componentes principales 1 y 3 del PCA.



**Figura 17.** Proyección de las componentes 1 y 3 del PCA con las todas las muestras de la granja Valtierra.

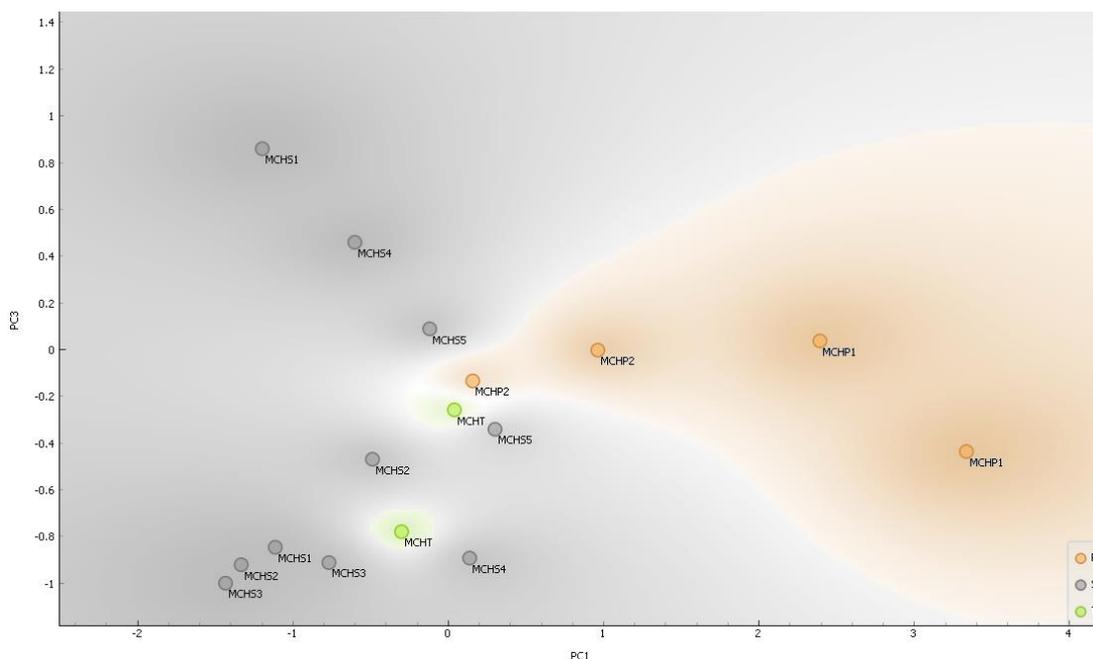
Tomando la proyección de las componentes más informativas para las muestras totales de animales individuales de todas las granjas, la 1 y la 3, no es posible observar ningún tipo de agrupación entre las muestras. La gran mayoría son procedentes de animales sanos y entre ellas se encuentran las muestras del tanque y las del animal patológico.

La correlación con los animales sanos fue de 0,797 y de 0,742, la asociación con las réplicas del animal patológico. En este caso, se pueden valorar estos datos como consecuencia del estado fisiológico del animal enfermo, puesto que se encontraba en una fase final del tratamiento y gozaba de un estado de salud muy positivo, a pesar de mantener la leche del animal apartada del resto de los animales. También se trata de un efecto negativo el hecho de no disponer de más muestras de animales patológicos, ya que existe una desproporción muy grande entre los dos grupos a estudiar.

### 6.3.3.3. Granja Murchante

Esta explotación es la más grande de las que se muestrearon para este proyecto, con un censo de 260 cabezas, incluyendo dos machos. Esto implica una estabulación “ordenada”, es decir, los animales se encuentran conviviendo con otros cuya edad o características son similares. A pesar de ello, no dispone de espacio para permitir a los animales encontrarse en un régimen de semilibertad. Se tomaron muestras de dos animales que sufrían mastitis.

En la Figura 18 se muestra la proyección de las componentes principales 1 y 3, que resultaron ser las más informativas para la descripción de los animales patológicos cuando se trabajó con el total de las muestras. Al aplicar estos criterios en la granja de Murchante, se observa una distribución similar a la del total de las muestras. Se agrupan las muestras de animales sanos mientras que se observan algo más dispersas las muestras de animales patológicos.



**Figura 18.** Proyección de las muestras de la granja Murchante en las componentes principales 1 y 3 del PCA.

En esta visualización llama la atención la situación de las réplicas de la muestra MCH\_P\_2, que parecen corresponderse mejor con un perfil de animal sano, al estar más separadas de las del otro animal enfermo de esta granja. Esta muestra MCH\_P\_1 resultó positiva en el test de haptoglobina, es decir la concentración en la leche de la proteína más relevante en la leche de vaca era superior a 2  $\mu\text{g/mL}$ . Este animal podría encontrarse en un estado patológico de mayor gravedad o más alejado de una posible recuperación temprana que MCH\_P\_2, haciendo que se desplace en la componente principal 1 hacia valores más elevados. Además, en esta componente uno de los lípidos con mayor relevancia es  $mz76$ , al igual que en la caracterización de las muestras en función de la concentración de haptoglobina.

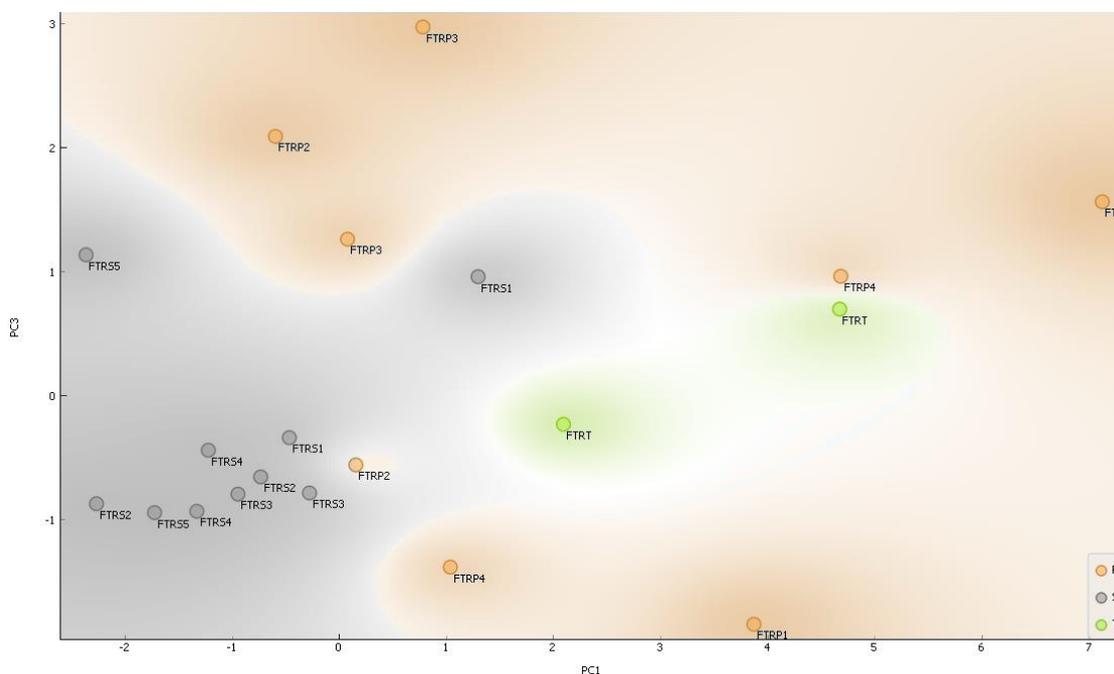
En esta línea, también cabe destacar la muestra MCH\_S\_5, puesto que fue la única muestra perteneciente a un animal sano que resultó positiva para haptoglobina, y cuyas réplicas, en esta distribución, se encuentran desplazadas hacia la zona que agrupa a los animales patológicos. Para poder validar esta aproximación, será necesario ampliar el

número de muestras y realizar una cuantificación de haptoglobina para realizar una aproximación más precisa, así como conocer de una manera más detallada el estado sanitario de los animales.

La granja Murchante presenta los tanques integrados entre la distribución de los animales sanos, sin embargo, la correlación no respalda esta percepción. La asociación con las muestras patológicas fue de 0,910 y la misma estimación con las muestras sanas fue de 0,891. Ambos son valores elevados de intensidad y el afinar esta estimación requiere, en primer lugar, el aumento del volumen de muestras, tanto sanas como patológicas.

#### 6.3.3.4. Granja Fitero

La granja de Fitero es un caso interesante ya que se encontraba, en el momento del muestreo, sufriendo una epidemia de mastitis que se prolongaba desde meses anteriores. Por tanto, existía una probabilidad mayor de encontrar animales pasando por un proceso subclínico, contagiados como consecuencia de la transmisión interna en la explotación. Además, se disponía de cuatro animales patológicos, todos ellos padeciendo mastitis. La proyección de las componentes principales 1 y 3 se muestra en la Figura 19.



**Figura 19.** Proyección de las componentes principales más informativas del PCA con las muestras de animales individuales y del tanque de la granja de Fitero.

Esta proyección presenta los animales considerados sanos agrupados entre sí con una dispersión muy baja. Por otro lado, se encuentran las muestras de animales enfermos con

una dispersión mayor, pero todos por encima de 0 en la componente principal 1, considerada la más relevante para este objetivo.

Lo más llamativo de esta distribución es que las dos réplicas del tanque de la granja se localizan en la zona de las muestras de animales enfermos. Es un resultado que encaja en la situación de la granja, debido a los graves problemas y pérdidas que ha sufrido como consecuencia de las infecciones mamarias. Además, se trata de una muestra que resultó ser positiva para haptoglobina, lo que es indicativo de que numerosos animales se encuentran en un proceso subclínico, al inicio de un proceso clínico o bajo condiciones de estrés.

Esta explotación obtuvo una calificación de “Bueno” en la última auditoría del protocolo Welfare Quality® por lo que, tanto el positivo en haptoglobina como el perfil lipídico medido en tanque parecen confirmar la situación epidemiológica de la explotación en el momento del muestreo, fortaleciendo la hipótesis de que las especies lipídicas identificadas puedan ser marcadores de enfermedad.

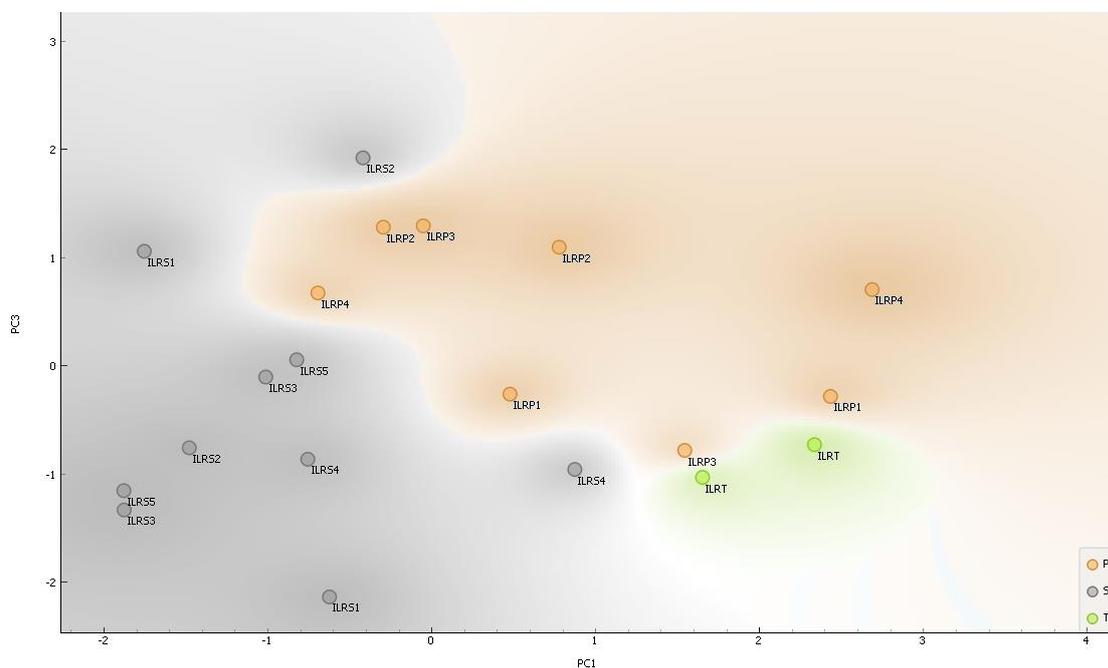
En línea con el párrafo anterior, la correlación en este caso fue de mayor intensidad con las muestras patológicas, obteniéndose un valor en la correlación de Pearson de 0,801 superior a la asociación con las muestras de animales sanos, cuyo valor fue de 0,766.

Resulta de gran interés la identificación del perfil lipídico de un tanque de una granja con problemas de infecciones, que afectan al bienestar animal, con marcadores comunes a las de animales enfermos (Rutten et al., 2013). Es necesario evaluar la aportación de cada animal al tanque para determinar en qué circunstancias se alterará la huella lipídica del tanque; pero, por el momento, estos resultados generan expectativas muy positivas de cara al desarrollo de herramientas basadas en biomarcadores que permitan anticipar y prevenir situaciones de estrés o enfermedades en las granjas.

#### **6.3.3.5. Granja Ilarregui**

Las características de esta granja son cada vez menos frecuentes en la industria láctea y cada vez cuesta más encontrar instalaciones como esta. Se trata de una pequeña explotación familiar con 30 animales en el censo que dispone de un establo para realizar las tareas relativas al ordeño, donde además los animales se alimentan durante la extracción de leche con pienso, mientras durante todo el día los animales se encuentran en régimen de libertad y acceso a paso *ad libitum*. El pasto con el que se preparan los forrajes que se complementa el pienso es el que rodea la explotación y al que tienen acceso

los animales durante todo el año. Estas características además condicionan el tipo de patologías que sufren estos animales encontrándose de manera mucho más frecuente lesiones del tipo traumatológicas.



**Figura 20.** Proyección de las muestras individuales y del tanque de la granja Iarregui sobre las componentes principales 1 y 3 del PCA.

En la Figura 20 se presenta la proyección de las componentes principales 1 y 3 con las muestras tanto individuales como del tanque de esta granja. En ella se observa una distribución similar a la del resto de granjas, destacando la situación de las réplicas de la muestra del tanque, localizadas en la zona en la que se ubican los perfiles de los animales patológicos. La correlación de Pearson además ha generado un valor de intensidad mayor para la asociación con las muestras de animales patológicos: 0,767 frente al valor de 0,717 con los animales sanos.

Es posible que la aportación de los animales que puedan encontrarse sufriendo un proceso patológico no diagnosticado o algún tipo de estrés sea más relevante que en el caso de otras granjas, dado que se diluye en muchos menos litros al disponer de menos animales en lactación. En el momento del muestreo, se encontraban 20 animales en rotación de ordeño, es decir la aportación de cada animal es del 5% sobre el total del tanque.

Por otro lado, los animales clasificados como patológicos muestreados en esta granja sufrían procesos que no están relacionados de una manera directa con la producción láctea, tratándose mayoritariamente de cojeras y lesiones traumatológicas. Sin embargo, al observarse capacidad de discriminación en base a los mismos lípidos que se han

identificado para caracterizar muestras de animales con problemas de mastitis, es posible que las variaciones en el perfil lipídico también se produzcan como consecuencia de una situación de malestar o estrés animal no específico.

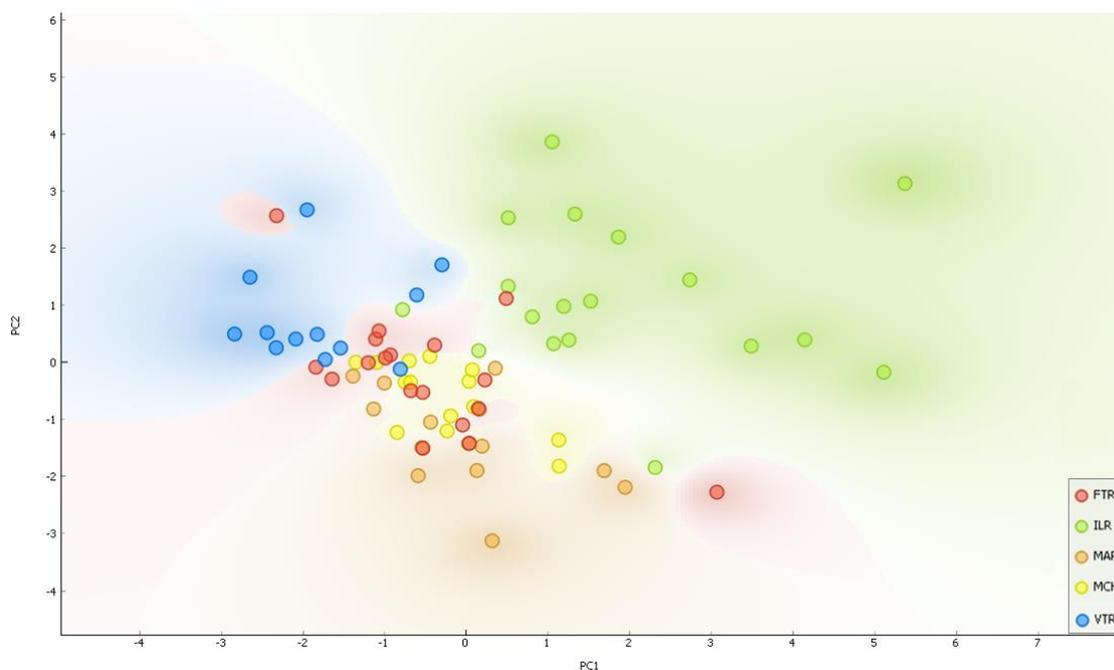
En futuro resultaría interesante la investigación de estas especies lipídicas como posibles marcadores de enfermedad o procesos en fases tempranas a lo largo del curso de la enfermedad, ya que, en el caso de las proteínas de fase aguda, el pico de concentración se alcanza a las 72 horas y no se mantiene la concentración alterada cuando se cronifica (González, Martínez-Subiela y Cerón, 2007). Resultaría de interés evaluar el momento a lo largo del curso de una enfermedad en el que estos biomarcadores recuperan el valor característico de los animales con un buen estado de salud, es decir cuánto tiempo se prolonga la alteración de estos lípidos como consecuencia de un estado fisiológico deteriorado.

#### **6.3.4. Determinación de las diferencias en el perfil lipídico de las muestras de leche en función de su origen**

La gestión de la granja afecta directamente a los animales y repercute en su estado sanitario y emocional y, por supuesto, en las características de la leche (von Keyserlingk et al., 2009). Son muchos los factores que influyen en la composición de la leche, pero entre ellos, los que son comunes dentro de una misma explotación se espera que repercutan en la composición de la leche de la misma forma, pudiéndose identificar marcadores característicos de la explotación.

Para buscar este tipo de marcadores en el perfil lipídico de las muestras de este proyecto, se realizó un Anova de un factor, habiéndose realizado previamente la validación de su aplicación en estas muestras con la prueba de Levenne. Se seleccionaron los diez picos más significativos para la separación de las muestras en función de su origen y se realizó un PCA proyectando sobre las componentes más informativas las muestras de todas las granjas, tanto de animales individuales, como de los tanques (ver Figura 21).

En la Figura 21 se observa la agrupación de las muestras de un mismo origen en el caso de dos granjas: Valtierra e Ilarregui. El resto de las muestras aparecen algo más dispersas e intercaladas entre sí, no pudiéndose observar una distinción en base a los marcadores que mejor resultado generaron en el Anova. A pesar de ello, se encuentran marcadamente diferenciadas de aquellas que pertenecientes a la granja de Ilarregui y a la de Valtierra.



**Figura 21.** Muestras de las granjas proyectadas sobre las componentes más informativas del PCA para discriminar en función del origen de cada granja.

Las muestras de la granja Ilarregui se encuentran agrupadas en el cuadrante superior derecho ( $PC1 > 0$ ,  $PC2 > 0$ ) y así como los individuos de la granja Valtierra se identifican por completo en el cuadrante superior izquierdo ( $PC1 < 0$ ,  $PC2 > 0$ ).

Uno de los factores que condicionan la composición lipídica de la leche es la alimentación, tratándose además de uno de los más relevantes, así como más estudiados. La alimentación en el caso de las muestras aquí presentadas es específica de cada granja, y, por tanto, es distinta en cada una de ellas (ver Anexo I).

Todas las dietas presentan un esqueleto similar, pero de cantidad y composición variables y determinadas por veterinarios especializados que adaptan las raciones a las condiciones de cada explotación. La granja que presenta una alimentación más diferenciada del resto es la de Ilarregui. Esta explotación dispone de pasto fresco mientras que todas las demás utilizan forrajes, elaborados a partir de diferentes plantas y combinadas entre sí, pero sin acceso a hierba húmeda. Las muestras de los animales que han podido pastar a voluntad se localizan en el rango de valores positivos de la componente 1. Sin embargo, en el caso de la granja Valtierra, que se observa diferenciada del resto de granjas y cuyas muestras se localizan agrupadas entre sí, dispone de una ración similar a la de las granjas que no es posible diferenciar.

Otra de las condiciones que influyen en el bienestar de los animales y, por consiguiente, en la composición de la leche es el tipo de estabulación y el espacio disponible para los animales. En todas las explotaciones las vacas podían moverse libremente, no se encontraban atadas, como ocurre en el sistema “tie-stall”, pero las explotaciones muestreadas presentaban tres grados de libertad de movimiento diferentes (Figura 22).



**Figura 22.** Tipos de estabulación de las granjas en las que se pudieron tomar muestras: 1. Valtierra: animales en semilibertad, con establos cubiertos y acceso a zona de esparcimiento de espacio limitado; 2. Ilarregui: animales de la explotación pastando en régimen de libertad; 3 y 4. Murchante: establos con animales separados en función de la edad y con acceso restringido al exterior.

En las imágenes 3 y 4 de la Figura 22, se muestran los animales estabulados en la granja de Murchante agrupados por edad y con posibilidad de tener acceso al aire libre, pero restringido a la decisión del ganadero con una puerta móvil. Este es el tipo de explotación más habitual en España, a pesar de que la agrupación o la clasificación de los animales en rebaños más pequeños sólo se da en las granjas con un censo relativamente grande. También es el tipo de estabulación que presentan las granjas de Fitero y Marcilla, que junto con la de Murchante, son las muestras que en la proyección de las componentes principales 1 y 2, se encuentran relacionadas entre sí y agrupadas.

El siguiente grado de libertad en el que pueden encontrarse las reses de una explotación lechera es del que dispone la granja Valtierra y que se ilustra en la imagen 1 de la Figura 22. Los animales tienen la posibilidad de moverse con libertad en un espacio restringido,

si bien más amplio que el propio establo. Disponen de refugios donde protegerse del clima y camas preparadas con paja.

El tipo de explotación de mayor libertad para los animales es el de la imagen 2 de la Figura 22, la granja de Ilarregui. Los animales pueden pastar libremente sin restricción de espacio y pueden alimentarse dado que el terreno es hierba fresca. A su disposición además tienen un pequeño establo en el que se les ordeña y encuentran el pienso y el forraje, en las épocas en las que es necesario complementar con él su alimentación por la escasez estacional en la naturaleza. Este tipo de sistema menos habitual en la producción industrial se conoce como sistema “free-walk”.

Las granjas cuyos animales se encuentran en un mayor grado de libertad son aquellas que se han podido agrupar entre sí y distinguir del resto en base a las especies lipídicas identificadas. Esto significa que los animales con condiciones de estabulación diferentes tienen perfiles lipídicos diferentes en su leche, la “libertad de los animales” puede ser identificada a través de marcadores lipídicos. Por tanto, dado que el tipo de instalaciones en las que se desarrolla la actividad ganadera influye en la movilidad de los animales y en su estado emocional, es decir, en su bienestar se podría valorar el estudio de estos lípidos como marcadores de bienestar, trabajando con información más precisa de los animales y de las granjas.

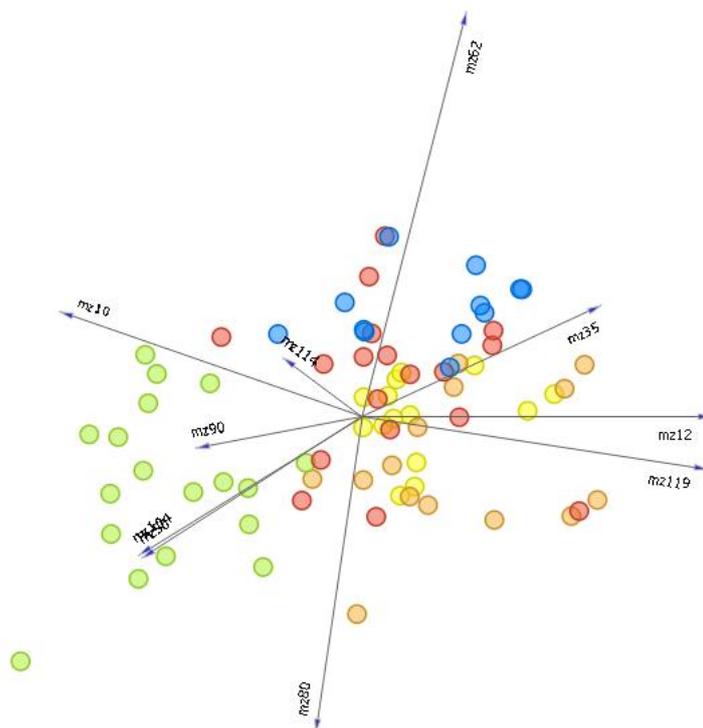
La proyección en la que se han observado estos resultados es la de las componentes principales 1 y 2, en las que los lípidos seleccionados tienen una carga relativa diferente. El peso relativo de cada uno de ellos en la distribución se presenta en la proyección no lineal de la Figura 23.

En ella se observa que los picos más relevantes en la caracterización de la granja Ilarregui son: mz50, mz90 y mz104, mientras que, para caracterizar las muestras de Valtierra, los lípidos más relevantes son: mz10, mz35, mz62 y m114.

Todos los lípidos que se utilizaron para realizar el PCA serán objeto de estudio a la hora de investigar la identificación de marcadores lipídicos de bienestar animal, concretamente en relación con las características de las explotaciones.

Este tipo de marcadores pueden resultar de gran interés en combinación con los sensores de movimiento, ya que aportaría información acerca de la repercusión de este factor sobre

el animal determinando de una manera objetiva, a través de un marcador fisiológico como es la síntesis lipídica en las ubres, el efecto del movimiento.



**Figura 23.** Proyección no lineal de las componentes principales 1 y 2 con la carga relativa de los 10 lípidos más significativos para la caracterización de las muestras según su origen.

Se presenta en la Tabla 11 la síntesis de los diez lípidos que mejor han descrito los grupos de muestras según su origen, estado patológico diagnosticado y resultado del test de haptoglobina.

Estado sanitario	Haptoglobina	Origen
mz25	mz27	mz10
mz34	mz76	mz12
mz59	mz86	mz35
mz61	mz87	mz50
mz76	mz113	mz62
mz113	mz131	mz80
mz139	mz188	mz90
mz164	mz214	mz104
mz207	mz229	mz114
mz212	mz247	mz119

**Tabla 11.** Lípidos más significativos para la clasificación en función de los criterios: estado sanitario, presencia de haptoglobina en leche por encima de los 2  $\mu\text{g}/\text{mL}$  y origen. Sombreados en el mismo color aquellos comunes a dos criterios distintos.

Destacados en el mismo sombreado se indican los dos únicos lípidos que han servido como clasificadores para dos categorías distintas. Estos son mz76 y mz113. Ambos son relevantes y útiles para la clasificación en función del estado sanitario y de la presencia de haptoglobina en leche y por ello destacan como potenciales marcadores tempranos de enfermedad. Su confirmación requerirá de un estudio más profundo acerca de las condiciones en las que pueden aplicarse y de una validación más robusta.

Por otro lado, destaca que los marcadores que permitieron caracterizar los grupos de muestras que presentaban un tipo de instalación con un sistema productivo característico no coinciden en ningún caso con los clasificadores para las demás categorías. Por tanto, se genera la oportunidad de estudiar este tipo de marcadores paralelamente para confirmar cuáles son los factores que modulan la síntesis de estas especies y la implicación de estos con el bienestar de los animales.

## 7. Conclusiones

Se ha detectado la presencia de haptoglobina en leche en concentraciones indicativas de estrés o enfermedad ( $> 2 \mu\text{g/mL}$ ) en el 25% de las muestras de animales sanos, reflejando una situación de déficit de bienestar en las granjas de vacuno de leche.

Los lípidos mz76 y mz113 se han identificado como potenciales biomarcadores en leche de enfermedad o estrés agudo, ya que están aletarados en la caracterización de las muestras de leche de animales enfermos y en fase aguda.

El estudio lipídico ha permitido identificar a través de diversas muestras de leche su procedencia en función de los sistemas de producción, clasificados según el grado de libertad que tienen los animales en cada uno, lo que afecta a su estado natural y, por tanto, a su bienestar.

La lipidómica puede convertirse en una potente herramienta de apoyo a la toma de decisiones para la prevención y el control sanitario, permitiendo también mejorar la evaluación del bienestar animal en las granjas, a través de la determinación del efecto fisiológico en los animales de las medidas adoptadas.

## 8. Conclusions

The presence of haptoglobin in milk at concentrations indicative of stress or disease ( $> 2 \mu\text{g/mL}$ ) has been detected in 25% of samples from healthy animals, reflecting a welfare deficit situation on dairy farms.

Lipids  $mz76$  and  $mz113$  have been identified as potential biomarkers in milk of disease or acute stress, as they are altered in the milk samples from sick and acute-phase animals.

The lipidomic study has enabled the identification of the origin of several milk samples according to their production systems, classified by the degree of freedom that the animals have in each one, which affects their natural state and, therefore, their welfare.

Lipidomics can become a powerful decision-support tool for health prevention and control and can also improve the assessment of animal welfare on farms by determining the physiological effect on animals of the actions taken.

## 9. Bibliografía

- Ahn, Y. J., Ganesan, P. y Kwak, H. S. (2011) Composition, structure, and bioactive components in milk fat globule membrane. *Korean Journal for Food Science of Animal Resources*, 13 (1), 1-8.
- Åkerstedt, M., Björck, L., Persson Waller, K. y Sternesjö, Å. (2006) Biosensor assay for determination of haptoglobin in bovine milk. *Journal of Dairy Research*, 73, 299-305. DOI: 10.1017/S0022029906001774
- Alais, C. (1985) *Ciencia de la leche. Principios de técnica lechera*. Barcelona: Reverté.
- Alonso-Fauste, I., Andrés, M., Iturralde, M., Lampreave, F., Gallart, J. y Álava, M. A. (2012) Proteomic characterization by 2-DE in bovine serum and whey from healthy and mastitis affected farm animals. *Journal of Proteomics*, 75 (10), 3015-3030. DOI: 10.1016/j.jprot.2011.11.035
- Astigarraga, E., Barreda-Gómez, G., Lombardero, L., Fresnedo, O., Castaño, F., Giralt, M. T., Ochoa, B., Rodríguez-Puertas, R. y Fernández, J. A. (2008) Profiling and imaging of lipids on brain and liver tissue by matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry using 2-mercaptobenzothiazole as a matrix. *Analytical chemistry*, 80, 9105-9114. DOI: 10.1021/ac801662n
- Bagga, A., Randhawa, S. S., Sharma, S. y Bansal, B. K. (2016) Acute phase response in lame crossbred dairy cattle. *Veterinary world*, 9 (11), 1204-1208. DOI: 10.14202/vetworld.2016.1204-1208
- Bezelgues, J.-B., Morgan, F., Palomo, G., Crosset-Perrotin, L. y Ducret, P. (2009) Short communication: Milk fat globule membrane as a potential delivery system for liposoluble nutrients. *Journal of Dairy Science*, 92, 2524-2528.
- Bionaz, M. y Loor, J. J. (2008) Gene networks driving bovine milk fat synthesis during the lactation cycle. *BMC Genomics*, 9 (366). DOI: 10.1186/1471-2164-9-36
- Blanco-Penedo, I., Ouweltjes, W., Ofner-Schröck, E., Brügemann, K. y Emanuelson, U. (2020) *Symposium review: Animal welfare in free-walks systems in Europe*. *Journal of Dairy Science*, 103, 5773-5782. DOI: 10.3168/jds.2019-17315

- Blokhuis, H. J. (2008) International cooperation in animal welfare: The Welfare Quality® project. *Acta Veterinaria Scandinavica*, 50 (S10). DOI: 10.1186/1751-0147-50-S1-S10
- Chilliard, Y., Glasser, F., Enjalbert, F., Ferlay, A., Bocquier, F. y Schmidely, P. (2007) Conferencia: Resultados recientes sobre los efectos de la alimentación en la composición en ácidos grasos de la leche de vaca, cabra y oveja. *Revista Argentina de Producción Animal*, 27 (3), 197-213.
- Consortio Welfare Quality® (2009) *Protocolo de evaluación Welfare Quality® para Ganado vacuno*. Países Bajos: Leystad.
- De Graaf, S., Ampe, B., Winckler, C., Radeski, M., Mounier, L., Kirchner, M. K., Haskell, M. J., van Eerdenburg, F. J. C. M., de Boyer des Roches, A., Andreasen, S. N., Bijttebier, J., Lauwers, L., Verbeke, W. y Tuytens, F. A. M. (2017) Trained-user opinion about Welfare Quality measures and integrated scoring of dairy cattle welfare. *Journal of Dairy Science*, 100, 6376-6388. DOI: 10.3168/jds.2016-12255
- De Vries, M., Bokkers, E. A. M., van Schaik, G., Botreau, R., Engel, B., Dijkstra, T. y de Boer, J. M. (2013) Evaluating results off the Welfare Quality multi-criteria evaluation model for classification of dairy cattle welfare at the herd level. *Journal of Dairy Science*, 96, 6264-6273. DOI: 10.3168/jds.2012-6129
- Dewettinck, K., Rombaut, R., Thienpont, N., Trung Le, T., Messens, K. y Van Camp, J. (2008) Nutritional and technological aspects of milk fat globule membrane material. *International Dairy Journal*, 18, 436-457. DOI: 10.1016/j.idairyj.2007.10.014
- Fernández, E., Martínez, J. A., Martínez, V., Moreno, J. M., Collado, L. R., Hernández, M. y Morán, F. J. (2015). “Documento de Consenso: importancia nutricional y metabólica de la leche”. *Nutrición Hospitalaria*, 3 (1), 92-101. DOI: 10.3305/nh.2015.31.1.8253
- Fraser, D., Weary, D. M., Pajor, E. A. y Milligan, B. N. (1997) A scientific conception of animal welfare that reflects ethical concerns. *Animal Welfare*, 6, 187-205.
- Gomes, F. y Henriques, M. (2016) Control of bovine mastitis: old and recent therapeutic. *Current Microbiology*, 72, 377-382.

- González, F. H. D., Martínez-Subiela, S. y Cerón, J. J. (2007) Haptoglobina en rumiantes: generalidades y posibles aplicaciones clínicas. *Anales de Veterinaria de Murcia*, 23, 5-17.
- Grönlund, U., Hallén Sandgren, C. y Persson Waller, K. (2005) Haptoglobin and serum amyloid A in milk from dairy cows with chronic sub-clinical mastitis. *Veterinary Research*, 36, 191-198. DOI: 10.1051/vetres:2004063
- Halasa, T., Huijps, K., Østerås, O. y Hogeveen, H. (2007) Economic effects of bovine mastitis and mastitis management: A review. *Veterinary Quarterly*, 29 (1), 18-31. DOI: 10.1080/01652176.2007.9695224
- Heikkilä, A.-M., Liski, E., Pyörälä, S. y Taponen, S. (2018) Pathogen-specific production losses in bovine mastitis. *Journal of Dairy Science*, 101 (10), 9493-9504. DOI: 10.3168/jds.2018-14824
- Herbut, P., Angrecka, S. y Walczak, J. (2018) Environmental parameters to assessing of heat stress in dairy cattle-a review. *International Journal of Biometeorology*, 62, 2089-2097. DOI: 10.1007/s00484-018-1629-9
- Hiitiö, H., Vakkamäki, J., Simojoki, H., Autio, T., Junnila, J., Pelkonen, S. y Pyörälä, S. (2017) Prevalence of subclinical mastitis in Finnish dairy cows: changes during recent decades and impact of cow and herd factors. *Acta Veterinaria Scandinavica*, 59 (22). DOI: 10.1186/s13028-017-0288-x
- Hiss, S., Mueller, U., Neu-Zahren, A. y Sauerwein, H. (2007) Haptoglobin and lactate dehydrogenase measurements in milk for the identification of subclinically diseased udder quarters. *Veterinarni Medicina*, 52 (6), 245-252.
- Huijps, K., Lam, T. J. G. M. y Hogeveen, H. (2008) Costs of mastitis: facts and perception. *Journal of Dairy Research*, 75, 113-120
- Huzzey, J. M., Duffield, T. F., LeBlanc, S. J., Veira, D. M., Weary D. M. y von Keyserlingk, M. A. G. (2009) *Short communication*: Haptoglobin as an early indicator of metritis. *Journal of Dairy Science*, 92 (2), 621-625. DOI: 10.3168/jds.2008-1526

- Jurinke, C., Oeth, P. y van den Boom, D. (2004) MALDI-TOF Mass Spectrometry: A versatile tool for high-performance DNA analysis. *Molecular Biotechnology*, 26, 147-163. DOI: 1073-6085/2004/26:2/147-163/\$25.00
- Kawai, K., Inada, M., Ito, K., Hashimoto, K., Nikaido, M., Hata, E., Katsuda, K., Kiku, Y., Tagawa, Y. y Hayashi, T. (2017) Detection of bovine mastitis pathogens by loop-mediated isothermal amplification and an electrochemical DNA chip. *Journal of Veterinary Medical Science*, 79 (12), 1973-1977. DOI: 10.1292/jvms.17-0263
- Keady, T. W. J., Mayne, C. S., Fitzpatrick, D. A. y McCoy, M. A. (2001) Effect of concentrate feed level in late gestation on subsequent milk yield, milk composition, and fertility of dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 84, 1468-1479.
- Keown, J. F., Everett, R. W., Empet, N. B. y Wadell, L. H. (1986) Lactation curves. *Journal of Dairy Science*, 69 (3), 769-781
- Krueger, A., Cruickshank, J., Trvisi, E., y Bionaz, M. (2020) Systems for evaluation of welfare on dairy farms. *Journal of Dairy Research*, 87 (S1), 13-19. DOI: 10.1017/S0022029920000461
- Llonch, P., Mainau, E., Ipharraguerre, I. R., Bargo, F., Tedó, G., Blanch, M. y Manteca, X. (2018) Chicken or the Egg: The reciprocal association between feeding behavior and animal welfare and their impact on productivity in dairy cows. *Frontiers in Veterinary Science*, 5 (305). DOI: 10.3389/fvets.2018.00305
- Manimaran, A., Kumaresan, A., Jeyakumar, S., Mohanty, T. K., Sejian, V., Kumar, N., Sreela, L., Prakash, M. A., Moventhan, P., Anantharaj, A. y Das, D. N. (2016) Potential of acute phase protein as predictor of postpartum uterine infections during transition period and its regulatory mechanism in dairy cattle. *Veterinary World*, 9 (1), 91-100. DOI: 10.14202/vetworld.2016.91-100
- Michalsky, M. C., Gassi, J. Y., Famelart, M. H., Leconte, N., Camier, B., Michel, F. y Briard, V. (2003) The size of native milk fat globules affects physico-chemical and sensory properties of Camembert cheese. *Lait*, 83 (2), 131-143. DOI: 10.1051/lait:2003003

- Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación (MAPA) (2020) *Raza bovina frisona* [en línea] disponible en <<https://www.mapa.gob.es/es/ganaderia/temas/zootecnia/razas-ganaderas/razas/catalogo-razas/bovino/frisona/default.aspx>> [consulta: 30/07/2020].
- Morin, P., Jiménez-Flores, R. y Pouliot, Y. (2007) Effect of processing on the composition and microstructure of buttermilk and its milk fat globules membranes. *International Dairy Journal*, 17 (10), 1179-1187. DOI: 10.1016/j.idairyj.2007.03.010
- OCDE/FAO (2019) *OCDE-FAO Agricultural Outlook 2019-2028*, OECD Publishing, París/Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO), Roma. DOI: 10.1787/7b2e8ba3-es
- Oltenu, P. A. y Algers, B. (2005) Selection for increased production and the welfare of dairy cows: are new breeding goals needed? *AMBIO: A Journal of the Human Environment*, 34 (4), 311-315.
- Oltenu, P. A. y Broom, D. M. (2010) The impact of genetic selection for increased milk yield on the welfare of dairy cows. *Animal Welfare*, 19, 39-49.
- Pereira P. C. (2014) “Milk nutritional composition and its role in human health”. *Nutrition*, 30, 619-627. DOI: 10.1016/j.nut.2013.10.011
- Polsky, L. y von Keyserlingk, M. A. (2017) *Invited review: Effects of heat stress on dairy cattle welfare. Journal of Dairy Science*, 100 (11), 8645-8657.
- Real Decreto 1246/2008, de 18 de julio, por el que se regula el procedimiento de autorización, registro y farmacovigilancia de los medicamentos veterinarios fabricados industrialmente. *Boletín Oficial del Estado*, núm. 193, de 11 de agosto de 2008, 34044-34084.
- Reglamento (CE) nº 853/2004, de 29 de abril de 2004, por el que se establecen normas específicas de higiene de los alimentos de origen animal. *Diario Oficial de la Unión Europea*, núm. L 139, de 30 de abril de 2004, 55.

- Rodríguez, R. y Ponce, P. (2004) Efecto del silvopastoreo como sistema sostenible de explotación bovina sobre la composición de la leche. *Livestock Research for Rural Development*, 16 (6), Art. 43.
- Ruegg, P. L. (2014) Management of mastitis on organic and conventional dairy farms. *Journal of Animal Science*, 81 (1), 43-55. DOI:10.2527/jas.2008-1217
- Ruegg, P. L. (2017) A 100-Year Review: Mastitis detection, management, and prevention. *Journal of Dairy Science*, 100, 10381-10397. DOI: 10.3168/jds.2017-13023
- Rutten, C. J., Velthuis, A. G. J., Steeneveld, W. y Hogeveen, H. (2013) *Invited review: Sensors to support health management on dairy farms. Journal of Dairy Science*, 96, 1928-1952. DOI: 10.3168/jds.2012-6107
- Schwudke, D., Schuhmann, K., Herzog, R., Bornstein, S. R. y Shevchenko, A. (2011) Shotgun lipidomics on high resolution mass spectrometers. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 3 (9), a004614. DOI: 10.1101/cshperspect.a004614
- Subdirección General de Producciones Ganaderas y Cinegéticas, Dirección General de Producciones y Mercados Agrarios. (2020) *Informe de coyuntura del sector vacuno de leche*. Madrid: Centro de Publicaciones del Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación.
- Vanderghem, C., Bodson, P., Danthine, S., Paquot, M., Deroanne, C. y Blecker, C. (2010) Milk fat globule membrane and buttermilks: from composition to valorization. *Biotechnology, Agronomy, Society and Environment*, 14 (3), 485-500.
- Von Keyserlingk, M. A. G. y Weary, D. M. (2017) A 100-Year review: Animal welfare in the *Journal of Dairy Science* —The first 100 years. *Journal of Dairy Science*, 100 (12), 10432-10444.
- Von Keyserlingk, M. A. G., Rushen, J., de Passillé, A. M. y Weary, D. M. (2009) *Invited review: The welfare of dairy cattle—Key concepts and the role of science. Journal of Dairy Science*, 92 (9), 4101-4111. DOI: 10.3168/jds.2009-2326
- Walstra P., Geurts, T. J., Noomen, A., Jellema, A. y Van Boekel, M. A. (2001) *Ciencia de la leche y Tecnología de los Productos Lácteos*. Zaragoza: Acribia.
- Walstra, P. y Jenness, R. (1986) *Química y física lactológica*. Zaragoza: Acribia

## Anexo I

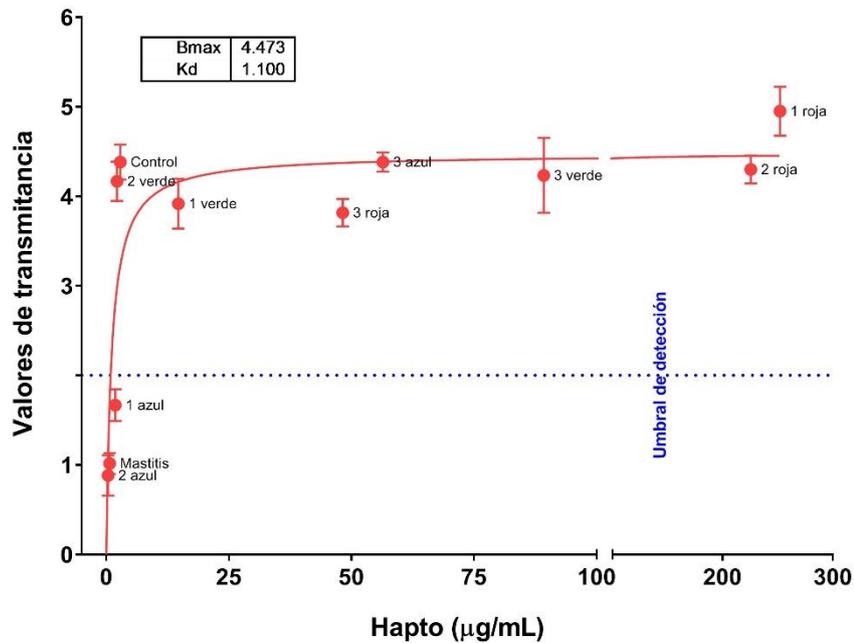
Granja	Referencia	Muestras animales sanos	Muestras animales patológicos	Muestras tanque	Censo (cabezas) *	Calificación Welfare Quality® auditoría más reciente	Alimentación	Observaciones
Alfajarín	ALF	-	-	1	70	BUENO	-	Tanque lleno de dos tandas de ordeño.
Montañana	MNT	-	-	1	50	SUFICIENTE	-	Tanque lleno de dos tandas de ordeño.
Miralbueno	MRB	-	-	1	60	BUENO	-	Tanque lleno de dos tandas de ordeño.
Movera	MVR	-	-	1	120	BUENO	-	Tanque lleno de dos tandas de ordeño.
Marcilla	MAR	5	3	1	90	SUFICIENTE	12 kg Pienso + 10 kg Silo alfalfa + 12 kg Silo Ray Grass + 4 kg Silo Festuca + 4 kg Silo guisante + 0,6 kg Paja	Muestras recogidas durante el ordeño de la tarde. Temperaturas por encima de los 40 °C.
Valtierra	VTR	5	1	1	105	BUENO	11 kg Pienso + 10 kg Silo Ray Grass + 13 kg Silo maíz + 10 kg Pulpa de remolacha + 1 kg Paja + 4 kg Alfalfa	Muestras recogidas durante el ordeño de la tarde, con el tanque en proceso de llenado de una única tanda. Calor y tormenta durante la visita.
Murchante	MCH	5	2	1	260	SUFICIENTE	-	Muestras tomadas durante el ordeño matutino con el tanque lleno de dos tandas de ordeño. Animales enfermos disponen de sus propios establos.
Fitero	FTR	5	4	1	90	BUENO	12 kg Pienso + 10 kg Silo Ray Grass + 26 kg Silo maíz	Muestra del tanque de dos tandas de ordeño, recogidas en una tarde de temperatura por encima de los 40 °C. Granja con problemas de mastitis, epidemia activa y con numerosos animales afectados a lo largo del verano.
Illarregui	ILR	5	4	1	30	BUENO	10 kg Pienso + 15 kg Silo hierba local + Pastoreo a discreción	Animales en libertad, pastando en colinas, lo que les ha provocado diferentes accidentes. Sobre todo, cojeras y lesiones en la espalda debido a la interacción entre ellas. Muestreo durante la mañana y con el tanque lleno de ese ordeño.

Resumen de los datos obtenidos de las granjas en las que se tomaron muestras de leche.

\* Número de reses registradas como productoras, no se tienen en cuenta terneros ni machos.

## Anexo II

Hapto (ug/mL)	0,37	0,67	1,81	2,19	2,86	14,71	48,2	89,2	56,4	225,6	252
Leche	Azul 2	Mastitis	Azul 1	Verde 2	Cntrl	Verde 1	Rojo 3	Verde 3	Azul 3	Roja 2	Rojo 1



Cuantificación mediante fluorímetro de campo (Dualux Force A) de las muestras empleadas como control interno, cuya concentración de Haptoglobina ha sido determinada mediante la técnica ELISA.