

Departament de Ciència Animal i dels Aliments



**Aplicación de termografía infrarroja y de sensores de pH y temperatura en
rumiantes**

*Application of infrared thermography and pH and temperature sensors in
ruminants*

*Aplicació de la termografia d'infrarojos i sensors pH i temperatura en
remugants*

TESIS DOCTORAL

Andreia Castro Costa

Bellaterra (Barcelona)

2013

UNIVERSITAT AUTONOMA DE BARCELONA

DEPARTAMENT DE CIENCIA ANIMAL I DELS ALIMENTS

**Aplicación de termografía infrarroja y sensores de pH y temperatura en
rumiantes**

*Application of infrared thermography and pH and temperature sensors in
ruminants*

***Aplicació de la termografia d'infrarojos i sensors de pH i temperatura en
remugants***

Tesis presentada per Andreia Castro Costa,
dirigida pel Dr. Gerardo Caja López del
Departament de Ciència Animal i dels Aliments,
i pel Dr. Jordi Aguiló Llobet del Departament de
Microelectrònica i Sistemes Electrònics, de la
Universitat Autònoma de Barcelona.

Bellaterra, 23 de octubre de 2013.

This is life!!!

*“Recordarás algo de lo que oigas, bastante de lo que veas,
mucho de lo que leas, y todo lo que hagas.”*

Adaptada de JOHN LITTLE.

AGRADECIMIENTOS

Por fin...ha llegado el tan esperado final...después de tantas barreras, esfuerzos, cambios profesionales, personales y todo eso sin olvidar el reto lingüístico. Ha sido difícil, pero los desafíos están siempre ahí, esperando a que una criatura se arriesgue a vencerlos. Aún así, los retos nunca son vencidos por uno mismo, siempre se cuenta con la colaboración, comprensión, fuerza, respeto y, principalmente, con o a pesar de la duda de las demás criaturas. Estas últimas hacen que los retos se vuelvan aún más desafiantes de lo que realmente son y nos mantienen centrados en el objetivo.

Una vez llegado el fin de una etapa, la mejor manera de disfrutarlo es compartir parte de esa victoria con todas aquellas personas que lo hicieron posible.

Quiero dar mis más sinceros agradecimientos a mi Director de Tesis, mi Profe, el Dr. Gerardo Caja López, quien a pesar de haber pensado algunas veces en echarme, todavía no lo ha hecho... Deseo expresar toda mi gratitud por su inmensa paciencia, dedicación y cariño que me ha dado en estos últimos años...Mil gracias Profe por haber sido tan cercano y por todos los momentos (buenos y malos) compartidos que me han ayudado a crecer como ser humano y como profesional, creando en mi más ilusión, ganas e interés en investigar y publicar: “¡nunca te fíes de nadie, ni de ti mismo!!”

A su vez, agradezco al Dr. Ahmed Salama su inestimable ayuda, gracias a la cual he aprendido muchos aspectos teóricos y prácticos sobre el proceso de investigación. Además le agradezco su disposición en buscar soluciones a los problemas.

Esta etapa de mi vida no podría haberse realizado sin el apoyo incondicional de mi jefe y amigo en Brasil, el Dr. Luiz Clovis Belarmino (muchas gracias Belo, ¡¡tú eres mi mentor!!) y ni sin la presencia de mi codirector de Tesis, el Dr. Jordi Aguiló Llobet, que me ha traído en brazos hasta este departamento. Y como no, “als profs” y amigos Dr. Ramón Casals por su buen humor, cariño, amistad, generosidad y por estar siempre disponible... ahora ya falta menos ¿verdad?. Y al Dr. José Francisco Pérez Hernández por sus dulces palabras en el momento justo, ¡¡muchas gracias!!

También agradezco la asistencia técnica del personal de la granja “Servei de Granges de la UAB”: Ramón Costa, Ramón Sáez (Don Ramón), Roger Ferrer (Rugeee), Sonia Andrés (Soniña Bonita), José Luis Ruiz (Pepe), Josep Vida (Pepim), Sergi Graboleda, Cristóbal Flores (Cristiño), Manel Pagés, Valeriano (Vale o no Vale) y Manolo Martínez (Seuuuu Manoloooo). A tots, ¡¡moltes gràcies!! Ahora sí que no hay como escaquearse, tengo que subir esa ladera en bici: “a la meva terra, una promesa és deute”. También agradezco la

asistencia técnica del personal del Laboratorio que me han enseñado el paso-a-paso de los análisis y que han escuchado mis historias de cabriñas y ovejiñas, muchas gracias a Blas Sanches y Carme Martínez.

Gracias a los compañeros de departamento por su amistad, ayuda, apoyo y por tantas horas compartidas de trabajo: Adel Saidi (Adelito), Paula Grassi (Pauliña), Monie Youssef (mi Nena), Najet Dkhili (Peque), Sofiane Hamzaoui (Sofi), Alejandra Rojas, Jean-Hubert Mocket y también agradezco a la Dra. Maristela Rovai por sus correcciones y ánimos constantes. A todas las secretarias del departamento, en especial a M^a. Dolores Medina, Consol Ruiz y Julia Lacuesta por su disposición para solucionar problemas.

Agradezco también a todos mis amigos de otros departamentos que estuvieron apoyándome incondicionalmente y depositando siempre su total confianza en mi objetivo final. En especial a los amigos administrativos Antonio M. Guerra (Tony) y Jordi Jovani Aubanell y a los amigos: Dr. Xavier Moll Sánchez, Dr. Joan Torrent y Dr. Mateu Creus, sin vuestra ayuda no estaría aquí.

Gracias a mis amigas de corazón y confidentes españolas: Consuelo, Carme, Elen, Vania y también a mis amigas brasileñas: Lele, Gege y Claudê, por los muchos momentos compartidos, y sobretodo por la amistad que no se quedó ahogada en medio del océano. Muito Obrigada Chicas!!

Y por fin, el agradecimiento más especial a mi familia española que me acogió, la cual me ha dado soporte para llegar hasta aquí: Gracias Enrique por haber hecho que esa conquista sea posible, por la confianza depositada en todos los momentos y por hacerme tan feliz.

También debo agradecer a mi mamá por darme la VIDA!!! This is Life!!!

Muito Obrigada!! Muchas Gracias!! Moltes Gràcies!!

Este trabajo es parte de un proyecto de investigación del Ministerio de Ciencia e Innovación de España (Plan Nacional I+D+i; Project AGL2009-09376)

Bellaterra, 23 de octubre de 2013.

Andreia Castro Costa

La línea de investigación de esta tesis ha dado origen a las siguientes publicaciones en revistas científicas y actas de simposios nacionales e internacionales:

Publicaciones en revistas internacionales:

- **Castro-Costa A.**, G. Caja, A. A. K. Salama, M. Rovai, C. Flores, and J. Aguiló. 2013. Thermographic variation of the udder of dairy ewes at early-lactation and following an *E. coli* endotoxin intramammary challenge at late-lactation. *J. Dairy. Sci.* (Accepted).
- **Castro-Costa A.**, A.A. K. Salama, G. Caja, X. Moll, and J. Aguiló. 2013. Using wireless telemetric sensors for evaluating the effects of diet and ambient temperature in non-lactating dairy goats. *J. Dairy. Sci.* (Submitted).
- **Castro-Costa, A.**, J. Torrent, A. A. K. Salama, M. Creus, G. Caja. 2013. The use of logistics regressions and cumulative normal distributions to model rumen pH and temperature change in dairy goats. *J. Dairy. Sci.* (Submitted).
- Salama A.A.k, G. Caja, S. Hamzaoui, B. Badaoui, **A. Castro-Costa**, D.A.E Façanha , M.M. Guilhermino, and Bozzi. 2013. Different levels of response to heat stress in dairy goats. *Small Rumin. Res.* (Accepted).

Simposios internacionales:

- **Castro-Costa A.**, J. Torrent, A. A. K. Salama, M. Creus, G. Caja. 2013. The use of logistic and cumulative normal distributions to model ruminal temperature and pH by radio frequency rumen boluses under different conditions in goats. *J. Dairy Sci.* 96(E-Suppl. 1):458 (Abstr.).
- **Castro-Costa, A.**, G. Caja, A. A. K. Salama, M. Rovai, and J. Aguiló. 2013. Using infrared thermography for detecting intramammary infections under practical and *E. coli* O55:B5 endotoxin challenge conditions in dairy ewes. *J. Dairy Sci.* 96(E-Suppl. 1):666 (Abstr.).
- **Castro-Costa, A.**, G. Caja, A. A. K. Salama, M. Rovai, and J. Aguiló. 2013. Exploring udder health by infrared thermography at milking in dairy ewes. 64th. Annual Meeting of the European Association for Animal Production, Nantes, France. p. 259 (Abstr.).

- Caja G., S. Carné, M.A. Rojas-Olivares, A.A.K. Salama, A. Ait-Saidi, J.H. Mocket, **A. Castro-Costa**, and J. Aguiló. 2010. Innovative technologies for sustainable management of small ruminants. 61th Annual Meeting of the European Association for Animal Production, Heraklion, Greece. Book of Abstracts 16:34 (Abstr.).

Simposios nacionales:

- **Castro-Costa, A.**, G. Caja, A. A. K. Salama, M. Rovai, and J. Aguiló. 2013. Utilización de la termografía de infrarrojos durante el ordeño para la detección de infecciones intramamarias en ovejas. XV Jornadas AIDA (Asociación Internacional para el Desarrollo Agrario) sobre Producción Animal, Zaragoza, España. Tomo II. pp. 816-818.

Lista de Abreviaturas

BW	Body weight
d	Day
Exp.	Experiment
g	Gram
h	Hour
mm	Millimeter
n	Sample size
NE	Net energy
<i>P</i>	Probability
RFID	Radio frequency identification
SE	Standard error of the mean
U	Unit
USB	Universal Serial Bus
VFA	Volatile Fatty Acid
wk	Week

Application of infrared thermography and pH and temperature sensors in ruminants

The aim of this Thesis was to evaluate the use of new technologies for livestock. The studied technologies were: 1) Infrared thermography (IRT), as a method for detecting intramammary infections (Exp. 1 and 2), and 2) ruminal biosensors to measure the evolution of ruminal pH and temperature (Exp. 3, 4 and 5). In Exp. 1, 83 dairy sheep (Manchega, $n = 48$; Lacaune, $n = 35$) were used to detect intramammary infections (IMI) by measuring the udder skin temperature (UST) by IRT. Udder IRT images were taken in duplicate before and after each milking (a.m. and p.m.) using a portable infrared camera (IRI 4010 Irisys, Northampton, UK) on a total of 10 sessions. Detection of IMI was performed by bacterial culture of milk samples in laboratory and by California Mastitis Test in the farm. In Exp. 2, 9 sheep at late lactation were used to induce an IMI like acute inflammatory response. Ewes were intramammary infused with a single dose of 1 mL endotoxin from *E. coli* O55:B5, 30 min after milking. The IRT and milk samples were taken at various time intervals until 73 h. Despite the accuracy of the camera (± 0.15 °C), able to detect the effects of milking ($P < 0.05$ to 0.001) and breed differences ($P = 0.003$), IRT was unable to detect the occurrence of clinical or subclinical IMI ($P = 0.48$) in sheep, neither the acute response to the infusion of *E. coli* endotoxin. In Exp. 3 and 4, we used a total of 16 Murciano-Granadina multiparous and non-lactating dairy goats, carrying rumen boluses with wireless sensors of pH and temperature (145×27 mm; KB1001, Kahne Bolus, NZ), previously introduced by surgery. In Exp 3 ($n = 8$) the effects of diet forage:concentrate 19 (F:C) ratio (HF, high forage 70:30; HC, high concentrate 30:70), fed at maintenance level and according to a crossover design, were evaluated on the variation of ruminal parameters throughout the day (every 30 min). The F:C ratio induced marked differences on the evolution of ruminal pH ($P < 0.001$), but not on ruminal temperature ($P = 0.40$). However, intake of cold water (9.8°C) dramatically reduced rumen temperature during 2 h (nadir, -3.5°C , $P < 0.001$). In Exp. 4, the goats ($n = 8$) were housed in metabolic cages, and submitted to environmental conditions of thermal neutral (TN, 20 to 23°C day and night; 45% humidity) and heat stress (HS, 37°C day and 30.5°C night; 40 % humidity) with constant photoperiod (day:night, 12:12 h), according to a crossover design. The ration consisted of a mixture F:C = 50:50 fed at maintenance level. Ruminal and rectal temperatures were affected by ambient temperature, being higher in the HS than in the TN goats ($P < 0.01$). Despite the fact that dry matter intake did not change by ambient temperature ($P = 0.18$), rumen pH decreased in the HS goats when compared to TN (-0.12 , $P = 0.003$) as a response to heat stress. Finally, Exp. 5 studied the effects of supplementing the same ration as in Exp. 4 with or without functional oils (C, control; FO, 1g/d of Essential, Oligo Basics Agroindustrial, Cascavel, Brazil) on ruminal pH and temperature. Joint data of Exp. 4 and 5, were used to model the evolution of ruminal pH and temperature using logistic regressions (LR) or cumulative normal distributions (CND). The CND proved to be as accurate as LR, but it was much easier to calculate. In conclusion, the infrared thermography was not useful for the detection of mastitis in farm conditions, but it detected differences produced by milking and breed. The use of biosensors allowed obtaining accurate information on ruminal pH under various conditions. The cumulative normal distribution was an adequate model to predict the pH of the rumen, although the temperature of the rumen showed no sufficient accuracy and it was needed to include other variables (i.e., ration type, ambient temperature conditions).

Aplicació de la termografia d'infrarojos i sensors de pH i temperatura en remugants

L'objectiu d'aquesta Tesi va ser avaluar l'ús de noves tecnologies en ramaderia. Amb aquest fi es van estudiar: 1) la termografia per infrarojos (IRT), com a mètode para la detecció de infeccions intramamàries (Exp. 1 i 2) i, 2) biosensors ruminals per mesurar l'evolució del pH i la temperatura (Exp. 3, 4 y 5). A l'Exp. 1, es van utilitzar 83 ovelles lleteres a l'inici de lactació (Manxega, $n = 48$; Lacaune, $n = 35$) per detectar infeccions intramamàries (IMI) a partir de la temperatura de la pell del braguer (UST) mesurada per IRT. Les imatges per IRT de les mamelles es van prendre abans i després de cada munyida (am i pm), mitjançant una càmera portàtil d'infrarojos (IRI 4010, Irisys, Northampton, UK), per duplicat i en un total de 10 sessions. La detecció d'IMI es va realitzar mitjançant cultiu bacterià de mostres de llet (al laboratori) i Califòrnia Mastitis Test (a la granja). A l'Exp. 2, es van utilitzar 9 ovelles al final de la lactació, en què es va induir una resposta inflamatòria aguda similar a la d'una IMI. Per a això es va infondre per via intramamària una única dosi de 1 mL de lipopolisacàrid d'*E coli* O55:B5, 30 min després de la munyida. Les imatges de IRT i mostres de llet es van prendre a diferents intervals de temps fins a les 73 h. Tot i la precisió de la càmera (± 0.15 °C), capaç de detectar els efectes de la munyida ($P < 0.05 - 0.001$) i la diferència entre races ($P = 0.003$), la IRT no va resultar d'utilitat per detectar l'aparició d'IMI clíniques o subclíniques ($P = 0.48$) en ovelles, així com tampoc la resposta aguda a la infusió d'*E coli*. A les Exp. 3 i 4, es van utilitzar un total de 16 cabres Murciano-Granadinas múltiples i no lactants, prèviament proveïdes de bolus ruminals amb sensors sense fils de pH i temperatura (145 × 27 mm; KB1001, Kahne Bolus, NZ) introduïts mitjançant cirurgia. A la Exp. 3 ($n = 8$) es van avaluar els efectes de la relació farratge:concentrat (F:C) de la ració (HF, alta en farratge, 70:30; HC, alta en concentrat, 30:70), a nivell de manteniment, en els paràmetres ruminals al llarg del dia (cada 30 min), segons un disseny creuat. La F:C de la ració va induir marcades diferències en l'evolució del pH del rumen ($P < 0.001$), però no en la temperatura ruminal ($P = 0.40$). No obstant això, la presa d'aigua freda (9.8 °C), va reduir marcadament la temperatura del rumen durant 2 h (nadir, -3.5 °C; $P < 0.001$). A l'Exp. 4, les cabres ($n = 8$) es van allotjar en gàbies metabòliques, es van sotmetre a condicions ambientals de termoneutralitat (TN, 20 a 23 °C dia i nit, 45% humitat) i estrès per calor (HS, 37°C de dia, i 30.5°C de nit; 40% humitat) amb fotoperíode constant (dia: nit, 12:12 h) segons un disseny creuat. La ració va consistir en una barreja amb F:C de 50:50 a nivell de manteniment. Les temperatures ruminal i rectal es van veure afectades per la temperatura ambient, essent més elevades en les cabres HS respecte a les TN ($P < 0.01$). Malgrat que la ingestió de matèria seca no es va veure afectada per la temperatura ambient ($P = 0.18$), el pH del rumen va ser inferior a les cabres HS respecte a les TN (-0.12; $P = 0.003$) en resposta a l'estrès tèrmic. Finalment, a l'Exp. 5 es va estudiar l'efecte de la suplementació o no de la mateixa ració de l'Exp. 4 amb olis funcionals (C, control; FO, 1 g/d d'Essential, Oligo Basics Agroindustrial, Cascavel, Brasil) en el pH i temperatura ruminals. Aquestes dades, juntament amb les de la Exp. 4 van ser utilitzades per modelitzar l'evolució del pH a partir de la temperatura ruminal utilitzant regressions logístiques (RL) o distribucions normals acumulatives (DNA). Les DNA van resultar tan exactes com les RL, però molt més senzilles de calcular. En conclusió, la termografia per infrarojos no va resultar útil per a la detecció de la mastitis en condicions de granja, però va detectar diferències produïdes per la munyida i la raça. L'ús de biosensors va permetre obtenir informació precisa sobre el pH del rumen en condicions diverses. La distribució normal acumulativa va ser un model adequat per predir el pH del rumen, encara que per la temperatura del rumen no va mostrar prou precisió i es va necessitar incloure altres variables (p.e. ració, temperatura ambient).

Aplicación de termografía infrarroja y sensores de pH y temperatura en rumiantes

El objetivo de esta Tesis fue evaluar el uso de nuevas tecnologías en ganadería. Para ello se estudió: 1) la termografía por infrarrojos (IRT), como método para la detección de infecciones intramamarias (Exp. 1 y 2) y, 2) biosensores ruminales para medir la evolución del pH y temperatura (Exp. 3, 4 y 5). En Exp. 1, se utilizaron 83 ovejas lecheras al inicio de lactación (Manchega, $n = 48$; Lacaune, $n = 35$) para detectar infecciones intramamarias (IMI) a partir de la temperatura de la piel de la ubre (UST) medida por IRT. Las imágenes IRT de las ubres se tomaron antes y después de cada ordeño (a.m y p.m), mediante una cámara portátil de infrarrojos (IRI 4010, Irisys, Northampton, UK), por duplicado y en un total de 10 sesiones. La detección de IMI se realizó mediante cultivo bacteriano de muestras de leche en laboratorio y California Mastitis Test en granja. En Exp. 2, se utilizaron 9 ovejas al final de la lactación, en las que se indujo una respuesta inflamatoria aguda similar a IMI. Para ello se infundió intramamariamente una única dosis de 1 mL de lipopolisacárido de *E. coli* O55:B5, 30 min después del ordeño. Las IRT y muestras de leche se tomaron a distintos intervalos de tiempo hasta las 73 h. Pese a la precisión de la cámara (± 0.15 °C), capaz de detectar los efectos del ordeño ($P < 0.05$ a 0.001) y la diferencia entre razas ($P = 0.003$), la IRT no resultó de utilidad para detectar la aparición de IMI clínicas o subclínicas ($P = 0.48$) en ovejas, así como tampoco la respuesta aguda a la infusión de *E. coli*. En los Exp. 3 y 4, se utilizaron un total de 16 cabras Murciano-Granadinas múltiparas y no-lactantes, previamente provistas de bolos ruminales con sensores inalámbricos de pH y temperatura (145×27 mm; KB1001, Kahne Bolus, NZ) introducidos mediante cirugía. En la Exp. 3 ($n = 8$) se evaluaron los efectos de la relación forraje:concentrado (F:C) de la ración (HF, alta forraje 70:30; HC, alto concentrado 30:70), a nivel de mantenimiento, en los parámetros ruminales a lo largo del día (cada 30 min), según un diseño cruzado. La F:C de la ración indujo marcadas diferencias en la evolución del pH del rumen ($P < 0.001$), pero no en la temperatura ruminal ($P = 0.40$). Sin embargo, la toma de agua fría (9.8 °C), redujo marcadamente la temperatura del rumen durante 2 h (nadir, -3.5 °C; $P < 0.001$). En Exp. 4, las cabras ($n = 8$) se alojaron en jaulas metabólicas, se sometieron a condiciones ambientales de termo-neutral (TN, 20 a 23 °C día y noche, 45% humedad) y estrés por calor (HS, 37 °C día y 30.5 °C noche; 40% humedad) con fotoperiodo constante (día:noche, 12:12 h), según un diseño cruzado. La ración consistió en una mezcla F:C = 50:50 a nivel de mantenimiento. Las temperaturas ruminal y rectal se vieron afectadas por la temperatura ambiente, siendo mas elevadas en las cabras HS respecto a las TN ($P < 0.01$). Pese a que la ingestión de materia seca no se vio afectada por la temperatura ambiente ($P = 0.18$), el pH del rumen fue inferior en las cabras HS respecto a TN (-0.12 ; $P = 0.003$) en respuesta al estrés térmico. Finalmente, en la Exp. 5 se estudió el efecto de la suplementación o no de la misma ración de la Exp. 4 con aceites funcionales (C, control; FO, 1 g/d de Essential, Oligo Basics Agroindustrial, Cascavel, Brasil) en el pH y temperatura ruminales. Estos datos, junto con los de la Exp. 4 fueron utilizados para modelizar la evolución del pH a partir de la temperatura ruminal utilizando regresiones logísticas (RL) o distribuciones normales acumulativas (DNA). Las DNA resultaron tan exactas como las RL, pero mucho más sencillas de calcular. En conclusión, la termografía por infrarrojos no resultó útil para la detección de mamitis en condiciones de granja, pero detectó diferencias producidas por el ordeño y la raza. El uso de biosensores permitió obtener información precisa sobre el pH del rumen en condiciones diversas. La distribución normal acumulativa fue un adecuado modelo para predecir el pH del rumen, aunque para la temperatura del rumen no mostró suficiente precisión y se necesitó incluir otras variables (i.e., ración, temperatura ambiente).

ÍNDICE

CAPÍTULO 1: INTRODUCCIÓN	1
1.1 CONTEXTO Y JUSTIFICACIÓN DE LA TESIS	2
CAPÍTULO 2: REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.....	1
2.1 BIOCLIMATOLOGÍA Y CAMBIO CLIMÁTICO.....	5
2.2 INTERÉS EN LA TELEDETECCIÓN.....	7
2.2.1 <i>Termografía por Infrarrojos.....</i>	<i>8</i>
2.2.1.1 Fundamentos de la Termografía por Infrarrojos	8
2.2.1.2 Mastitis.....	11
2.2.1.3 Métodos para Detección de Mastitis en Rumiantes	12
2.2.1.4 Cámara de Termografía de Infrarrojos.....	14
2.2.1.4.1 Factores del objeto a medir	14
2.2.1.4.2 Factores ambientales	15
2.2.2 <i>Tecnología de los Biosensores Ruminales</i>	<i>16</i>
2.2.2.1.1 Medidores de pH ruminal.....	19
2.2.2.1.2 Medidores de temperatura ruminal.....	21
CAPÍTULO 3: OBJETIVOS.....	25
CAPÍTULO 4: _USO DE LA TERMOGRAFÍA DE INFRARROJOS PARA DETECTAR_MASTITIS EN OVEJAS LECHERAS.....	27
4.1 CALIBRACIÓN DE LA CÁMARA DE TERMOGRAFÍA INFRARROJA.....	27
4.2 RELACIÓN ENTRE TEMPERATURAS: AMBIENTE, CORPORAL Y DE LA UBRE	29
4.3 THERMOGRAPHIC VARIATION OF THE UDDER OF DAIRY EWES AT EARLY-LACTATION AND FOLLOWING AN <i>E. COLI</i> ENDOTOXIN INTRAMAMMARY CHALLENGE AT LATE-LACTATION (<i>VARIACIÓN DE IMÁGENES TERMOGRÁFICAS DE LAS UBRES DE OVEJAS LECHERAS AL INICIO DE LACTACIÓN Y DESPUÉS UNA CHALLENGE INTRAMAMARIA CON ENDOTOXINA E. COLI AL FINAL DE LACTACIÓN</i>)	29
<i>Resumen.....</i>	<i>29</i>
<i>Abstract.....</i>	<i>30</i>
4.3.1 <i>Introduction.....</i>	<i>31</i>

4.3.2 <i>Material and Methods</i>	32
4.3.2.1 Experiment 1	33
4.3.2.1.1 Animal and management conditions	33
4.3.2.1.2 Milk recording and sampling	33
4.3.2.1.3 Udder skin temperature.....	34
4.3.2.2 Experiment 2	35
4.3.2.2.1 Animal and management conditions	35
4.3.2.2.2 Endotoxin challenge.....	35
4.3.2.2.3 Clinical observations and milk sampling	36
4.3.2.2.4 Udder skin temperature.....	36
4.3.2.3 Statistical Analyses.....	37
4.3.3 <i>Results and Discussion</i>	37
4.3.3.1 Experiment 1	37
4.3.3.1.1 Milk yield	37
4.3.3.1.2 Subclinical mastitis.....	38
4.3.3.1.3 Clinical mastitis.....	38
4.3.3.1.4 Udder temperature variations factors	39
4.3.3.2 Experiment 2	41
4.3.3.2.1 Clinical signs and body temperature	41
4.3.3.2.2 Milk yield and composition.....	44
4.3.3.2.3 Udder skin temperature.....	47
4.3.4 <i>Conclusions</i>	50
CAPÍTULO 5: USO DE SENSORES RUMINALES EN CABRAS LECHERAS NO-LACTANTES.....	51
5.1 CARACTERÍSTICAS FÍSICAS DE UN SENSOR DE PH RUMINAL.....	51
5.2 PROCEDIMIENTO DE CONFIGURACIÓN E INSERCIÓN DEL BIOSENSOR RUMINAL.....	53
5.2.1 Descripción del bolo ruminal KB1001	53
5.2.2 Configuración.....	54
5.2.3 Calibración	55
5.2.4 Transmisión	56
5.2.5 Cirugía Ruminal.....	57
5.2.6 Validación de la Tecnología Usada	57

5.4 USING WIRELESS TELEMETRIC SENSORS FOR EVALUATING THE EFFECTS OF DIET AND AMBIENT TEMPERATURE IN NON-LACTATING DAIRY GOATS. (<i>USO DE SENSORES DE TELEMETRÍA INALÁMBRICA PARA EVALUAR LOS EFECTOS DE LA RACIÓN Y LA TEMPERATURA AMBIENTE EN CABRAS NO-LACTANTES</i>)	58
<i>Resumen</i>	58
<i>Abstract</i>	59
5.4.1 <i>Introduction</i>	60
5.4.2 <i>Materials and Methods</i>	61
5.4.2.1 Experiment 1	62
5.4.2.1.1 Animals, management conditions, and treatments	62
5.4.2.1.2 Sampling, measurements, and analyses	63
5.4.2.2 Experiment 2	65
5.4.2.2.1 Animals, management conditions, and treatments	65
5.4.2.2.2 Measurements, sampling and analyses	66
5.4.2.3 Statistical Analyses	66
5.4.3 <i>Results and Discussion</i>	67
5.4.3.1 Experiment 1	67
5.4.3.1.1 Feed intake and water consumption	67
5.4.3.1.2 Ruminal pH and temperatures.....	68
5.4.3.2 Experiment 2	73
5.4.3.2.1 Feed intake	73
5.4.3.2.2 Ruminal pH and temperature.....	74
5.4.3.2.3 Digestibility coefficients.....	77
5.4.3.2.4 Blood parameters measurement.....	77
5.4.4 <i>Conclusions</i>	79
5.5 THE USE OF LOGISTIC REGRESSIONS AND CUMULATIVE NORMAL DISTRIBUTIONS TO MODEL RUMEN PH AND TEMPERATURE CHANGES IN DAIRY GOATS. (<i>USO DE REGRESIÓN LOGÍSTICA Y DISTRIBUCIÓN NORMAL ACUMULATIVAS PARA PREDECIR LA TEMPERATURA Y EL PH RUMINAL EN CABRAS LECHERAS</i>)	79
<i>Resumen</i>	79
<i>Abstract</i>	80
5.5.1 <i>Introduction</i>	81
5.5.2 <i>Materials and Methods</i>	82

5.5.2.1 Animals and Management Conditions	82
5.5.2.2 Wireless Ruminant Boluses.....	83
5.5.2.3 Calculations and Statistical Analysis.....	83
<i>5.5.3 Results and Discussion</i>	<i>84</i>
<i>5.5.4 Conclusions.....</i>	<i>88</i>
CAPÍTULO 6: CONCLUSIONES	89
6.1 CONCLUSIONES ESPECÍFICAS	89
6.2 CONCLUSIÓN GENERAL	90
CAPÍTULO 7: BIBLIOGRAFIA	91

CAPÍTULO 1: INTRODUCCIÓN

CAPÍTULO 1

INTRODUCCIÓN

Hoy en día la industria alimentaria enfrenta cambios críticos en respuesta a las necesidades de los consumidores que, además de referirse a salud y seguridad exigen productos alimenticios con control de calidad. En este sentido, la ganadería moderna necesita nuevos métodos de control de calidad para satisfacer las demandas de los clientes y no perder rentabilidad económica.

Como resultado de investigaciones recientes se han desarrollado nuevas tecnologías (hardware y software) que permiten controlar con eficacia y precisión diversos parámetros fisiológicos relacionados con la salud de los animales y la calidad de sus producciones lo que a su vez, posibilita nuevas aplicaciones. Sin embargo, existen pocos trabajos que evalúen el uso de estas nuevas tecnologías en la práctica a fin de descartar posibles efectos no deseados, comprobar sus valores y validar sus posibles aplicaciones en la práctica.

Desde la década de los 80, se ha trabajado en dispositivos capaces de medir algunos parámetros considerados indicadores de la salud en vacas. Estos dispositivos están basados en el uso de sensores (Hogeveen et al., 2010; Hovinen y Pyörälä, 2011) o en sistemas de sensores que constan de varios sensores constituyendo el dispositivo propiamente dicho, además del firmware y software para procesamiento de datos. Ejemplos de sensores aplicados en ganadería son los de medida de la conductividad eléctrica y de color de la leche para detectar mamitis (Kamphuis et al., 2010); de aceleración, que se colocan en las patas de la vacas (podómetros) para detectar su actividad (Chapinal et al., 2011); sensores para detección de celo (Saint-Dizier y Chastant-Maillard, 2011); de temperatura ruminal (AlZahal et al., 2011); de temperatura corporal (Ipema et al., 2008); de saturación del oxígeno de la sangre (pulsioxímetro de pulso) y ritmo respiratorio (Nagl et al., 2003) o de localización de los animales mediante GPS.

Por otro lado, algunos dispositivos con los que se opera, no se ajustan a la definición utilizada de sensor, visto que los sistemas de sensores no constituyen todavía un dispositivo automatizado. Por ejemplo, las cámaras térmicas con sistemas de infrarrojos se han utilizado para la detección de mastitis, sin embargo, estos dispositivos son de tipo manual y no automatizado (Berry et al., 2003; Colak et al., 2008; Hovinen et al., 2008; Polat et al., 2010).

Aunque dichos trabajos han descrito una asociación entre la mamitis y la temperatura de la piel de la ubre, no existe consenso sobre los valores a partir de los que la ubre está infectada o sana.

1.1 CONTEXTO Y JUSTIFICACIÓN DE LA TESIS

El descubrimiento del transistor en 1947 y con él el nacimiento de la electrónica moderna, representa el inicio de lo que se conoce como la revolución de la información y que ha dado origen a la llamada sociedad de la información. Diez años después ya era posible fabricar e interconectar varios de estos transistores sobre un sustrato único, dando origen al circuito integrado. En 1971, Intel comercializaba el primer microprocesador (Intel-4004 con 2500 transistores) y posteriormente, en 1974, el i-8080, el primero de propósito general (con 4500 transistores y capaz de realizar 200.000 operaciones por segundo a una frecuencia de 2 MHz).

Hoy los microprocesadores pueden contener casi mil millones de transistores en 4×4 cm², operar a una frecuencia de varios GHz y ejecutar más de mil millones de instrucciones por segundo. No cabe duda que estos avances repercuten directamente en nuestra sociedad, tanto desde el punto de vista de procesamiento y gestión de la información, como en el de la transmisión de información bajo distintos formatos (sonido, imagen o datos en general).

Indudablemente y como en todos los campos de aplicación, esta evolución ha significado progresos netos en muchos sectores. La agricultura es un ejemplo de esta evolución, la cual se demuestra por los avances en la llamada agricultura de precisión, en los sistemas de información geográfica, en el procesado y la gestión de datos y en la transmisión de los mismos a los usuarios. Además, la evolución tecnológica también ha llegado a nivel de aplicaciones en granjas, tales como: control ambiental de alojamientos ganaderos, control lechero en salas de ordeño, trazabilidad en la industria cárnica, identificación de animales mediante la imagen de la retina, detección de enfermedades, monitorización de la digestión en el rumen, así como monitorización de la salud y bienestar del ganado por medio de imágenes infrarrojas, entre otras aplicaciones.

En unos pocos años las cifras de mercado de las TICs (Tecnologías de la Información y las Comunicaciones) han ido creciendo hasta situarlas en el primer lugar en el mundo, lo que ha significado grandes posibilidades de desarrollo tecnológico que con este mercado tienen totalmente asegurada su rápida amortización. Con ello ha sido posible aplicar la “miniaturización” a otros dispositivos y con otros tipos de materiales. Conforme se avanza en

la miniaturización, estos microsistemas reducen su tamaño a la vez que aumenta su capacidad y la posibilidad de incluir nuevos componentes que constituyen sistemas “embebidos” que pueden “empotrarse” en distintos objetos entrando a formar parte de ellos.

La llegada de la nanociencia y la nanotecnología, no ha hecho sino abrir mucho mas estos nuevos horizontes (Feynman, 1959). El hecho que las Micro y Nano tecnologías compartan dimensiones con la biología y la medicina (membrana y corpúsculos celulares, genes, virus, proteínas...) y con la ciencia de materiales (macromoléculas, tratamientos superficiales, polímeros, cerámicas, ...) todos ellos trabajando en la escala de los cientos de nanómetros o inferior está permitiendo descubrir innumerables nuevas aplicaciones en todos los campos. Los Micro-Nano-Bio sistemas, apoyados por una cada vez más potente capacidad de tratamiento de datos, están empezando a ser una realidad. De forma general, se acepta que somos capaces siquiera de imaginar mas que el 20% de las aplicaciones especialmente en el mundo de la medicina y los productos farmacéuticos, el medio ambiente, los alimentos y la nutrición, así como de la salud por medio del desarrollo de materiales que respondan a variables físicas (luz, olor, radiación infrarroja, campo electromagnético, o combinaciones de éstos).

Así, los avances en las TICs, junto a los correspondientes en Nanociencia y Nanotecnología están abriendo aún mayores posibilidades y aportando mayor valor añadido en muy distintos campos de aplicación, y forzando la evolución y progresos netos en muchos sectores.

Por otra parte, desde hace más de 20 años, los científicos comenzaron a alertar del calentamiento global que está directamente asociado a un cambio climático producido por el impacto de las actividades humanas en el clima de la Tierra. La principal causa del calentamiento global es el efecto invernadero, fenómeno que se refiere a la acumulación de calor como consecuencia de la formación de una capa refractaria de gases atmosféricos, principalmente (IPCC, 2007): vapor de agua, dióxido de carbono (CO_2), metano (CH_4), óxido nitroso (N_2O) y ozono (O_3). Lo preocupante es que el aumento de estos gases produzca un ascenso de la temperatura de la Tierra debido al calor atrapado en la baja atmósfera.

De acuerdo con las estimaciones del IPCC (2007), la ganadería contribuye con un 18% al calentamiento global, debido a las emisiones de gases de efecto invernadero (9% CO_2 , 37% CH_4 y 65% N_2O). En especial, las emisiones de CH_4 a la atmósfera por los rumiantes, varían con la edad, peso corporal, calidad del alimento y eficiencia digestiva (Paustian et al., 2006), entre otros. Optimizar las raciones en los rumiantes puede suponer marcadas reducciones en

las emisiones de CH₄ (Kotschi y Müller-Säman, 2004). Así, si se considera que un bovino emite aproximadamente 100 kg CH₄/año (IDF, 2009) y que hay unos 1.300 millones de bovinos en el Mundo, ello supone unos 130 Mt de CH₄.

En este escenario de calentamiento global, en el que sus efectos en el ganado pueden ser vistos como un problema y los multi-microsistemas inalámbricos como parte de la posible solución, se decidió llevar a cabo esta tesis doctoral con el objetivo de validar experimentalmente el uso de microsistemas y biotelemedicina, en ovejas y cabras en condiciones de granja, y explorar las nuevas oportunidades que pueden aportar las micro-nano-bio tecnologías en la práctica.

El presente trabajo plantea la evaluación de una cámara de imágenes por infrarrojos, como un método precoz para la detección de infecciones intramamarias, y la utilización de biosensores ruminales, en forma de bolos, para monitorizar los efectos digestivos del tipo de ración y de la temperatura ambiente a fin de mejorar la eficiencia digestiva y reducir el estrés por calor y la producción de gases de efecto invernadero.

El trabajo experimental de la Tesis está constituido por 3 experimentos. El primero hace referencia al uso de la termografía por infrarrojos para la detección de infecciones intramamarias en 2 experiencias realizadas al inicio (Exp. 1.1) y a final (Exp. 1.2) de la lactación. Para ello se utilizaron 2 razas de ovejas lecheras realizando su seguimiento durante la lactación y el caso de una infección aguda simulada mediante la infusión de endotoxina de *E. coli*. 1 al final de lactación.

El segundo experimento constó también de 2 experiencias en las que se evaluaron los efectos de la calidad de la ración (Exp. 2.1), comparando raciones con distinto porcentaje de forraje:concentrado (F:C), y de la temperatura ambiente en las mismas condiciones de alimentación y controladas de estrés térmico y termo neutralidad (Exp. 2.2).

Finalmente, el tercer experimento, compara el uso de la regresión logística y la distribución normal acumulativa, para evaluar los efectos del calor y de la administración de suplementos de aceites funcionales, en el pH y temperatura ruminales.

CAPÍTULO 2: REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

CAPÍTULO 2

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1 BIOCLIMATOLOGÍA Y CAMBIO CLIMÁTICO

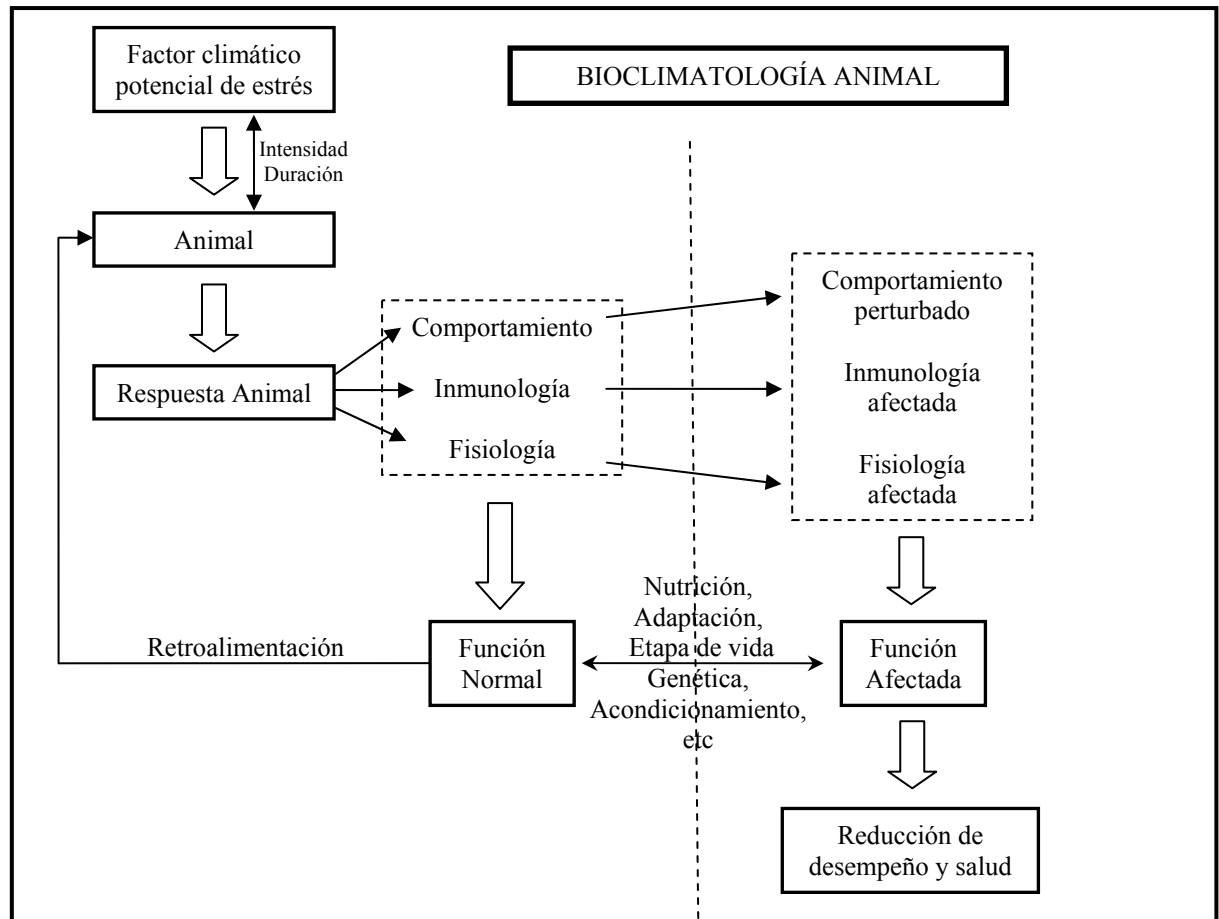
La bioclimatología es la ciencia que estudia los efectos biológicos del tiempo y el clima sobre los organismos vivos y su entorno (Carmona, 1987). Para ello, la bioclimatología elabora índices y modelos que demuestran esta relación, permitiendo predecir y monitorizar los efectos del clima en la fisiología de los animales y valorar su capacidad de adaptación (Rivas-Martínez, 2004). En ganadería interesa además valorar los efectos del clima en la cantidad y calidad de las producciones animales. Los riesgos climáticos más frecuentes se deben a olas de calor y sequías, normalmente acompañados de otros factores, como: radiación solar, viento, humedad y presión atmosférica, etc.

Cada animal se adapta fisiológicamente a su medio ambiente. El clima y sobre todo sus agentes son algunos de los principales factores de la modificación de la respuesta del animal. La temperatura y la humedad, son los agentes de mayor importancia en el caso de los animales homeotermos (de sangre caliente), que se caracterizan por poseer un dispositivo de termorregulación fisiológica bien desarrollado, lo que les permite mantener su temperatura corporal dentro de un rango estrecho, prácticamente constante, a pesar de la variación de la temperatura ambiente. La termorregulación es resultado de un equilibrio entre la ganancia (termogénesis) y la pérdida (termólisis) de calor (Fuquay, 1981). Con estos dos recursos fisiológicos, termogénesis y termólisis, el rumiante necesita mantener su temperatura corporal, independiente de su propia producción de calor y de las condiciones ambientales, para que todas las funciones fisiológicas y reacciones metabólicas celulares se realicen de una forma equilibrada (Morand-Fehr and Doreau, 2001).

Cada especie animal, raza o categoría, tiene una zona de confort térmico, que está relacionada con su estado fisiológico (Figura 2.1), en la que el organismo no hace esfuerzos por ganar o perder energía térmica (Silva y Maia, 2013). Fuera de esa zona de confort, el animal sufre estrés para mantener su homeotermia, requiriendo así energía adicional para

regular su temperatura, en detrimento de la energía disponible para otros procesos de producción (Bianca, 1976).

Figura 2.1 Respuesta animal al estrés térmico (Adaptado de Curtis, 1983).



Como consecuencia el animal modifica su comportamiento, especialmente la alimentación, las funciones fisiológicas, metabólicas y digestivas. De acuerdo con McDowell (1969), el estrés por calor experimentado por rumiantes, principalmente causado por altas temperaturas con bajas humedades, afecta directamente al metabolismo y digestibilidad del animal, entre otros efectos.

Los animales tienen dos mecanismos fundamentales para intercambiar calor con el medio ambiente: 1) evaporación (sudoración y jadeo) y 2) no-evaporación (radiación, conducción, convección), siendo la eficiencia de cada mecanismo dependiente de la diferencia entre la temperatura corporal y temperatura ambiental, humedad relativa, velocidad del aire, y no menos importante, la radiación solar (Silva y Maia, 2013).

El enfriamiento por **evaporación** desde la superficie exterior del animal es el mecanismo más eficaz de disipación de calor en condiciones cálidas y secas. Cuando aumenta la cantidad de humedad relativa del ambiente, la sudoración disminuye y las pérdidas de calor por evaporación se reducen.

La cantidad de **radiación** absorbida por un objeto no sólo depende de la temperatura del objeto, sino también en su color y textura. En animales con piel más oscuras se absorbe más calor do que los animales de color clara a la misma temperatura.

El flujo de calor entre dos medios o cuerpos en contacto directo se describe como intercambio de calor por **conducción**. Para los animales, la conducción se produce entre el animal y el aire circundante o a través del contacto directo con otro objeto.

Cuando el aire frío entra en contacto con un cuerpo caliente, una capa de aire que rodea la superficie del cuerpo se calienta y se eleva alejándose del cuerpo, llevando con ella el calor, y enfriando de ese modo el cuerpo a través del proceso de la **convección**. Por el contrario, si la temperatura del aire es mayor que la temperatura de la piel, entonces el movimiento del aire promoverá el movimiento de calor en el animal hasta que la temperatura de la piel sea igual a la temperatura del aire.

2.2 INTERÉS EN LA TELEDETECCIÓN

La teledetección es la metodología de obtención de información de un objeto, área o fenómeno, por medio de los datos adquiridos por un sensor que no está en contacto directo con el objeto, a través de mediciones de la energía electromagnética reflejada o emitida por dicho objeto bajo investigación (Chuvieco, 1995).

El término teledetección no existe en inglés, en su lugar se utiliza el término “remote sensing”, que es un término acuñado a mediados de los años 1950 por la geógrafa/oceanógrafa Evelyn Pruitt (San Francisco, 1918-2000), durante el tiempo que trabajó para el ONR (USA Office Naval Research).

Actualmente, la teledetección es multidisciplinar y su avance es dependiente de tres aspectos diferentes: 1) los sensores, que permiten captar la información que se quiere adquirir, 2) los dispositivos utilizados para el envío de esa información y, 3) la forma en que se analizan los datos. Parte de estos aspectos se basan en la mejora del conocimiento científico y otra parte se basa en el desarrollo tecnológico (Pinilla, 1995).

La radiación electromagnética medida por los sensores procede de los cuerpos observados y llegar al radiómetro por medio de emisión, reflexión y difusión. Desde el punto de vista del origen de la radiación, se pueden distinguir en la teledetección varios métodos de teledetección (Callejo et al., 2009), correspondientes a:

- Métodos pasivos: Se recibe la radiación emitida directamente por el cuerpo observado, reflejado o difundido por radiación (p.ej., el Sol). Utilizan radiación propia o emitida.
- Métodos activos: Son los que necesitan de la intervención del operador para iluminar el objeto y conseguir una imagen. En este caso siempre utilizan la radiación reflejada o difundida para la observación y nunca la emitida.

2.2.1 Termografía por Infrarrojos

La termografía es una técnica de teledetección que se ocupa de la medición de la temperatura radiada por los objetos. En consecuencia, permite medir temperaturas a distancia y sin necesidad de contacto físico con el objeto. Es posible convertir las mediciones de la radiación infrarroja emitida por un objeto en valores de temperatura, esto se logra midiendo la radiación emitida en la porción infrarroja del espectro electromagnético (0.7 a 15 μm de longitud de onda) desde la superficie del objeto y convirtiendo estas medidas en señales eléctricas (Chuvienco, 1995). El espectro electromagnético incluye los rayos gamma, rayos X, ultravioletas, infrarrojos, microondas y ondas de radio. Todas estas radiaciones viajan en la velocidad de la luz y la diferencia entre ellas es su longitud de onda y frecuencia (Figura 2.2).

El calor producido por la luz del sol, del fuego o de cualquier objeto caliente provienen del infrarrojo. Aunque no podamos ver esta radiación, las terminaciones nerviosas de nuestra piel pueden sentirla como calor. También utilizamos rayos infrarrojos cuando usamos una unidad de control remoto de un televisor, por ejemplo.

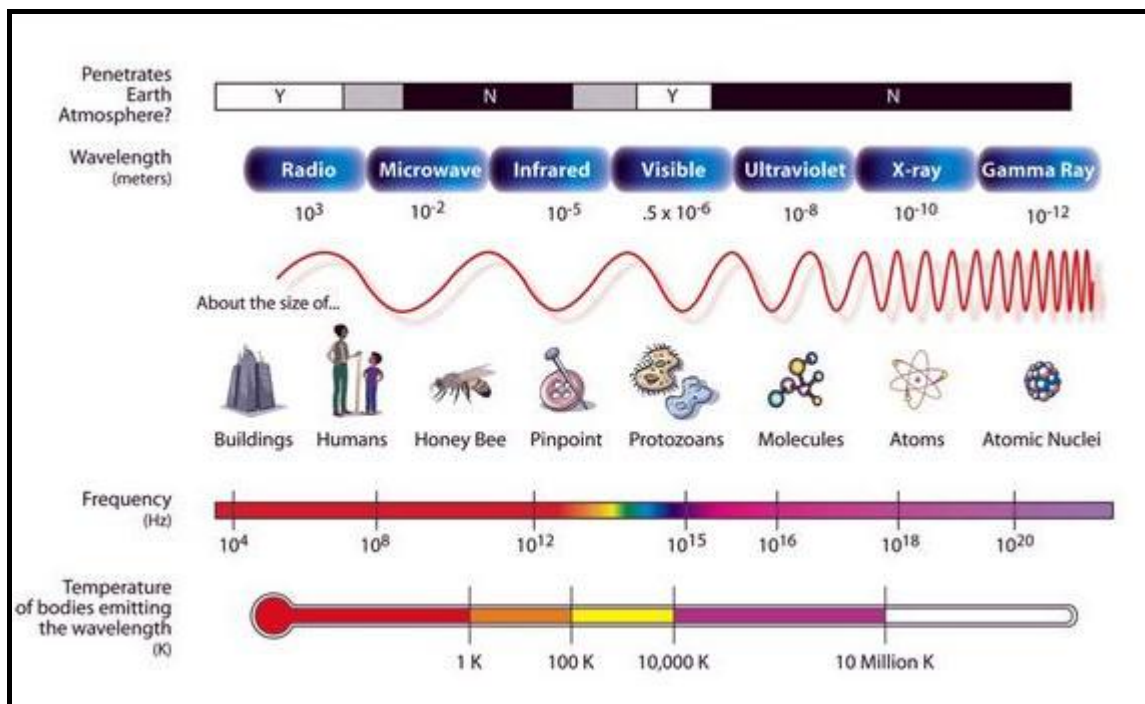
Así la termografía por infrarrojos es capaz de producir una imagen visible de luz infrarroja invisible (para nuestros ojos) emitida por objetos (método pasivo) de acuerdo a su condición térmica.

2.2.1.1 Fundamentos de la Termografía por Infrarrojos

El descubridor de los rayos infrarrojos fue Frederick William Herschel, nacido en 1738 en Hannover (Alemania), que se interesó en verificar cuanto calor pasaba por filtros de diferentes

colores al observar el sol. Se dio cuenta que esos filtros de diferentes colores dejaban pasar diferentes cantidades de calor. Luego hizo pasar luz del sol por un prisma de vidrio, formándose un espectro (el "arco iris" que se forma cuando se divide a la luz en sus colores). Haciendo controles de temperatura en los distintos colores del espectro verificó que más allá del rojo (fuera de las radiaciones visibles) la temperatura era más elevada. Por otro lado, se dio cuenta que esta radiación invisible se comportaba de la misma manera que la luz visible desde el punto de vista de la reflexión, refracción, absorción y transmisión. Estos resultados demuestran que el calor puede transmitirse en forma de luz invisible y que hay otra forma de iluminación o radiación invisible al ojo humano. Inicialmente se denominó rayos caloríficos y posteriormente infrarrojos, que quiere decir inferior al nivel de energía del rojo (Callejo et al. 2009).

Figura 2.2 Radiación infrarroja en el espectro

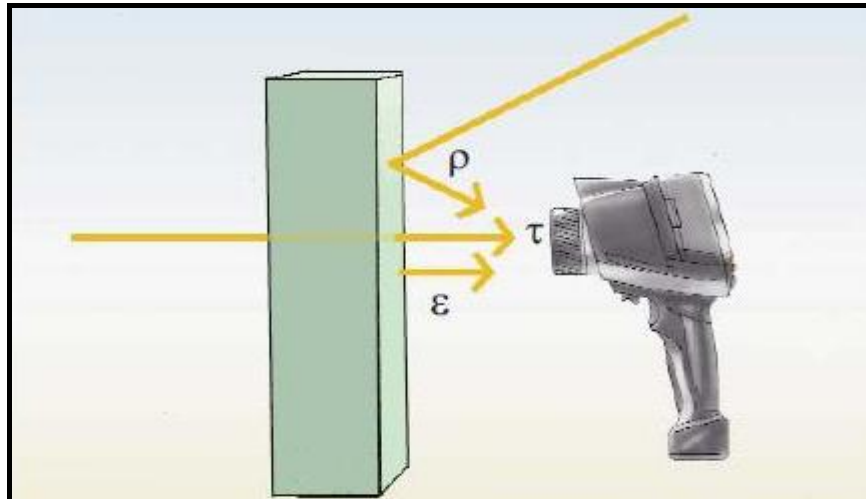


Las cámaras termográficas miden la onda larga de la radiación infrarroja recibida en el campo de visión y, a partir de ella, calcula la temperatura del objeto a medir (Figura 2.3).

La radiación infrarroja es la señal de entrada que la cámara termográfica necesita para generar una imagen de un espectro de colores, en el que cada uno de los colores, según una

escala determinada, significa una temperatura distinta, de manera que la temperatura medida más elevada aparece en color blanco (Vollmer et al., 2011).

Figura 2.3 Emisión (ϵ), reflexión (ρ) y transmisión (τ) de una cámara termográfica.



El cálculo tiene en cuenta la emisión (ϵ) de la superficie del objeto medido, así como la compensación de la temperatura reflejada (CTR); estas dos variables se ajustan manualmente en la cámara, para corregir las medidas de acuerdo con las condiciones en que se realiza.

Emisividad (ϵ). Es la capacidad que tiene un cuerpo para emitir infrarrojos, en relación a la de un cuerpo negro perfecto que presenta una $\epsilon = 1$. Es el parámetro más importante e imprescindible para un ajuste preciso de la cámara. La ϵ está fuertemente influida por el tipo de objeto, la estructura y estado de su superficie, pero en algunos objetos depende además de la temperatura del propio objeto. La piel humana, así como la de la mayor parte de los animales (sin pelo ni plumas), presenta una $\epsilon \sim 1$.

Reflexibilidad (ρ). Es la capacidad de un objeto de reflejar la radiación infrarroja. La ρ depende de las propiedades de la superficie, la temperatura y el tipo de objeto. Resulta imprescindible realizar una compensación de las medidas termográficas por la temperatura ambiente reflejada (CTR), tal como se ha comentado.

Transmisibilidad (τ). Es la medida de la capacidad de un objeto de transmitir (permitir el paso a su través) de la radiación infrarroja. La τ depende del tipo y grosor del objeto, muchos objetos son impermeables a la radiación infrarroja de onda larga (e.g. espejo, cristal).

Actualmente, la tecnología de la termografía por infrarrojos está en plena expansión en todas sus aplicaciones, tales como: astronomía, seguridad pública, electrónica, meteorología, ingeniería de procesos, mantenimiento industrial, análisis de la vegetación, estudio de las temperaturas y su relación con las enfermedades humanas y de animales.

2.2.1.2 Mastitis

La mastitis es un tema de gran importancia debido a los altos costos de la infección intramamaria (IMI) que afecta al ganado lechero en todo el mundo. El grado de la enfermedad depende de la naturaleza del patógeno (Rebhun, 1995; McGavin et al., 2007), de la raza (Mitchell, 2013) y del estado de lactación de los animales (Boutinaud et al., 2003).

Los agentes causantes de mamitis se clasifican en patógenos contagiosos o mamarios, ambientales y oportunistas. Tales patógenos están subdivididos en patógenos mayores (o principales) y menores (o secundarios), en función del grado de daño o lesión que provocan en la glándula mamaria (Gonzalo et al., 2004).

La Figura 2.4 muestra una invasión de bacterias en la ubre desde el exterior del pezón. A continuación las bacterias se multiplican en la ubre, produciendo daños en las células epiteliales mamarias (lactocitos) que forman los alvéolos, con posterior liberación de enzimas (NAGasa y *L-Lactato deshidrogenasa* (LDH), entre otras.

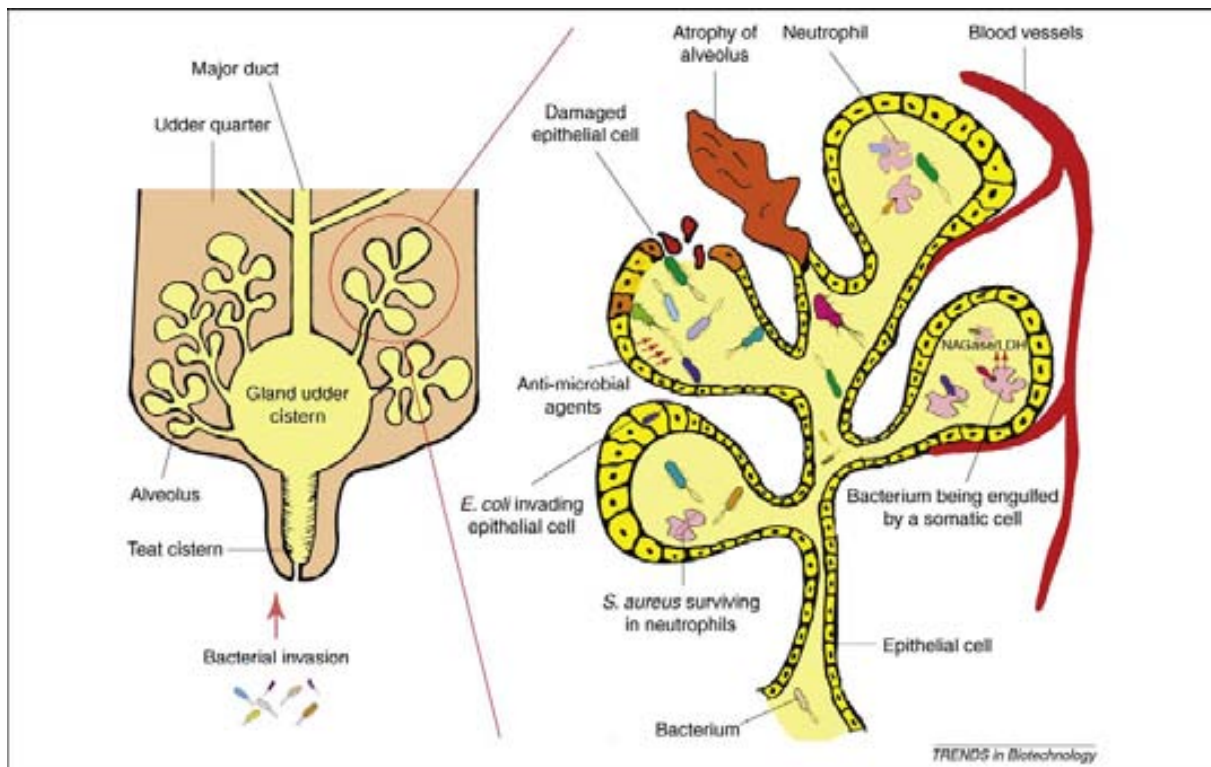
Como mecanismo defensivo las bacterias invasoras son atacadas por leucocitos (i.e., neutrofilos) y las células epiteliales mamarias segregan compuestos anti-microbianos en la leche (i.e. lactoferrina, amilode sérico). Según la el tipo y severidad de la inflamación en la ubre, la mamitis puede ser clasificada como: sub-clínica, clínica y crónica o aguda.

Mastitis sub-clínica es una inflamación que puede no ser detectada en su estadio inicial, pudiendo pasar desapercibida. La mastitis sub-clínica en ovejas se debe principalmente a estafilococos coagulasa negativo (CNS), tal como *Staphylococcus epidermis* que se encuentran de forma habitual en la piel de la ubre o pezón (Berger et al., 2004).

La mastitis clínica se caracteriza por ser una inflamación aguda de la ubre que se manifiesta con síntomas clínicos visibles, normalmente con textura dura, aspecto enrojecido y más caliente, disminuyendo la producción y alterando la composición de la leche. Los efectos de la inflamación aguda de la glándula mamaria persisten en muchos casos (ubre asimétrica,

nódulos en uno o en dos mitades de la ubre, hipertrofia de nódulos linfáticos), lo que constituye una importante causa de desecho de los animales afectados (Viguier et al., 2009).

Figura 2.4 Representación esquemática del desarrollo de mastitis en una ubre infectada (Viguier et al. 2009).



La incidencia de mastitis clínicas no suele ser superior al 5% del rebaño (Berger et al., 2004) y su principal causa son agentes microbianos tales como *Staphylococcus aureus* y, en menor grado, *Streptococcus uberis* y *Streptococcus spp.* La incidencia de mamitis clínicas durante el período del secado es elevada en vacas lecheras, en las que oscila en entre 28 a 33.5% según datos de Canadá (Olde Riekerink et al., 2008) y Holanda (Lam et al., 2013), pero no parece representar un riesgo alto de mastitis clínica en el caso de las ovejas.

2.2.1.3 Métodos para Detección de Mastitis en Rumiantes

Tradicionalmente se utilizan métodos de diagnóstico de IMI basados en la detección de la inflamación de la glándula mamaria, la alteración de la calidad de la leche y el aislamiento de

agentes patógenos causales (Viguier et al., 2009). Los métodos que analizan la calidad de la leche incluyen el recuento de células somáticas (**RCS**) o la detección de bio-marcadores tales como los enzimas NAGasa (N-acetil- β -D-glucosaminidasa) y LDH (L-lactato deshidrogenasa). Estas técnicas de diagnóstico no se pueden utilizar en controles rutinarios en rebaños porque no son suficientemente rápidas para la detección de los primeros signos de IMI. Una prueba rápida conocida es el Test de California para Mastitis (CMT), sin embargo, su interpretación es subjetiva y puede generar resultados falsos (i.e., al inicio de lactación).

Cordes y Borchert (2012) desarrollaron sensores de medición de LDH para equipos de ordeño DeLaval (Suecia) en los que se aplica un modelo biométrico para emitir alarmas, aunque la precisión del sistema para detectar mastitis en condiciones de campo es todavía baja.

Adicionalmente, se están investigando otras alternativas de detección de mastitis que utilizan la teledetección, tal como el uso de sistemas *on-line* durante el ordeño de los animales. El uso de sensores *on-line* para detectar mamitis fue propuesto por Kamphius et al. (2008), pero su utilización es todavía hoy muy reducida, posiblemente debido a los costes de cada medición.

El sistema mas utilizado actualmente es la medida de la conductividad de la leche, que se ve aumentada en el caso de mastitis, pero no es un parámetro suficientemente sensible para la detección de los primeros signos de la enfermedad (Hovinen, 2009). Otra metodología para distinguir entre leche sana y leche con mastitis clínica fue propuesta por Eriksson et al. (2005) basada en el uso de un sistema sensor de gases (nariz electrónica). El sistema detecta los componentes volátiles presentes en la leche con mastitis, tales como los sulfuros, cetonas, aminos, productos de oxidación de los lípidos y ácidos de la leche, aunque su desarrollo es todavía insuficiente.

En este sentido, está disponible comercialmente un sistema basado en un analizador en el infrarrojo cercano o NIR (IMA, AfiMilk, Afikim, Israel) para medir la presencia de sangre y células somáticas en la leche (Leitner et al., 2012), pero todavía no existen datos disponibles para evaluar la exactitud del sistema en la detección de la mastitis en condiciones de campo.

Avances recientes en técnicas proteómicas ofrecen además información útil sobre los diferentes patrones de expresión de las proteínas presentes en la leche con mastitis y las proteínas expresadas por los patógenos. Sin embargo, se necesita más investigación para

aplicar por sí solos, o en combinación con los anteriormente comentados, estos nuevos biomarcadores para detección automática de mastitis (Viguiet et al., 2009).

Otra alternativa propuesta para detectar precozmente la mastitis es el aumento de la temperatura de la glándula mamaria mediante el uso de la termografía. Berry et al. (2003) desarrollaron un modelo predictivo para medir la temperatura de la superficie ubre como consecuencia del ejercicio, temperatura ambiente y ritmo circadiano, concluyendo que la termografía por infrarrojos ofrece suficiente precisión para la detección de mastitis en vacuno. Barth (2000) llegó a la conclusión de que la termografía ofrece resultados prometedores para la detección temprana de la mastitis clínica, pero no parece ser adecuada para la detección de mastitis subclínicas. Por otro lado, Colak et al. (2008) y Polat et al. (2010) indicaron que termografía por infrarrojos tenía una capacidad de diagnóstico predictivo similar al CMT en las vacas lecheras.

2.2.1.4 Cámara de Termografía de Infrarrojos

Existen algunos factores que influyen en la cantidad de radiación infrarroja que las cámaras termográficas detectan y por tanto deben ser considerados ya que influyen en los resultados de las medidas (Revillas, 2011).

2.2.1.4.1 Factores del objeto a medir

Reflexión especular. La reflexión especular es resultado de superficies altamente reflectantes, o sea de baja emisividad. Algunos objetos reflejan la radiación térmica del mismo modo que un espejo refleja la luz visible, de ese modo la radiación térmica del propio operador podría indicar falsos puntos calientes, provocando una interpretación incorrecta de la imagen termográfica. Para evitarlo se debe elegir el ángulo desde el que la cámara termográfica apunta al objeto, con el fin de evitar dichas reflexiones.

Color. El color del objeto no tiene un efecto perceptible en la radiación infrarroja de onda larga. La radiación emitida depende de la temperatura y no del color de la superficie del objeto a medir. Sin embargo, las superficies oscuras absorben calor más rápido que las claras y se calientan antes, por lo que debe tenerse en cuenta.

Humedad, nieve o escarcha en la superficie. El agua, la nieve y la escarcha tienen unas emisividades relativamente altas ($0.85 < \varepsilon < 0.96$), por lo que la medición a través de ellas se

realiza sin problemas normalmente. Sin embargo, hay que tener en cuenta que la temperatura del objeto a medir puede estar distorsionada.

Suciedad y partículas en la superficie. La suciedad en la superficie del objeto a medir (e.g., polvo, heces o paja) aumenta la emisividad, por lo que la medición en objetos manchados presenta problemas. Debe tenerse en cuenta además que la cámara termográfica siempre mide la temperatura de la superficie, es decir, en este caso de la suciedad, y no la temperatura de la superficie del objeto que hay debajo.

Distancia y tamaño del objeto. Para obtener una buena medida termográfica se requiere un tamaño del objeto tal que cubra un área mínima de la cámara a fin de asegurar su representatividad. La distancia al objeto se debe tener en cuenta, pero no modifica sensiblemente la medida

2.2.1.4.2 Factores ambientales

Temperatura ambiente. Este parámetro se utiliza para compensar temperatura reflejada así como de la emisividad (ϵ) con la finalidad de que la cámara calcule correctamente la temperatura del objeto medido. En muchas aplicaciones, la temperatura reflejada corresponde a la temperatura ambiente.

Humedad ambiente. La humedad relativa debe ser lo suficientemente baja para que no haya condensación (neblina) en el aire, o vaho en el objeto a medir, en el filtro de protección o incluso en el objetivo de la cámara. Si éste (o el filtro) se ha empañado, parte de la radiación infrarroja que llega a la cámara se pierde porque no puede penetrar la lente.

Corrientes de aire. Cualquier flujo o corriente de aire afecta a la medición puesto que reduce la temperatura del objeto. Como resultado del intercambio de calor (convección), el aire cercano a la superficie tiene la misma temperatura que el objeto medido. Si hay corrientes de aire, esta capa desaparece sustituida por otra capa cuya temperatura todavía no se ha adaptado a la del objeto. Por medio de la convección, el objeto medido desprende o absorbe calor hasta que la temperatura de su superficie y la del aire se igualan. El efecto del intercambio de calor se incrementa cuanto mayor es la diferencia de temperatura entre la superficie del objeto a medir y la temperatura ambiente.

Radiación. Todo objeto con temperatura superior al cero absoluto (0° Kelvin = -273.15° C) emite radiación infrarroja, por lo que especialmente los objetos con una gran diferencia de

temperatura respecto al cero absoluto pueden alterar la medición infrarroja como resultado de su propia radiación. Se deben evitar estas fuentes de interferencia en la medida de lo posible. Apantallando estas fuentes (p.ej. con una lona o un cartón) se minimizan estos efectos negativos, pero si aun así no se pueden evitar, hay que tener en cuenta que la temperatura reflejada en ese caso no se corresponde con la temperatura ambiente.

Polución. Algunas materias suspendidas en el aire, como polvo o humo, pueden falsear la medición, puesto que emiten su propia radiación infrarroja que se recibe en la cámara termográfica. Además, estas materias dispersan y absorben parte de la radiación infrarroja emitida por el objeto, por lo que ésta no se detecta en su totalidad en la cámara.

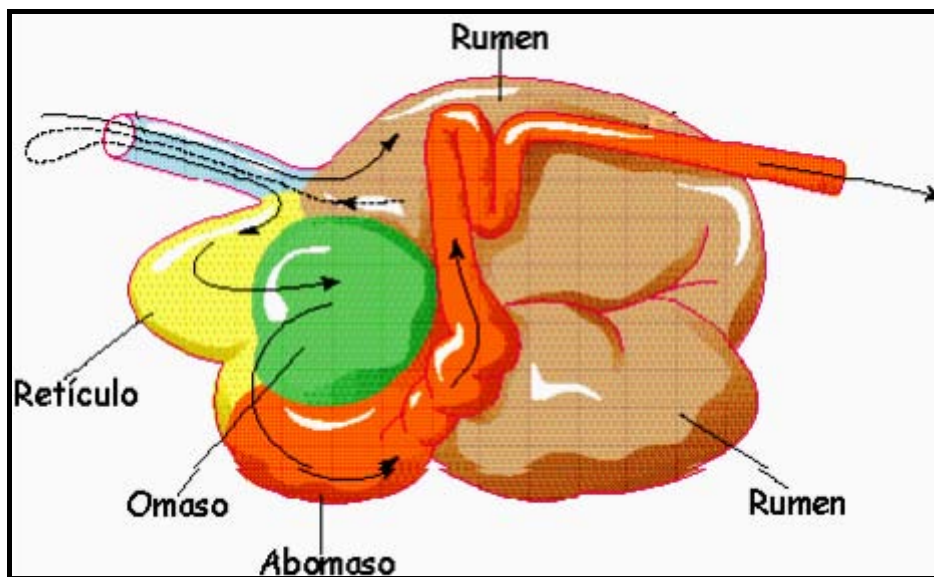
Luz y campos magnéticos. Algunas fuentes de luz caliente emiten radiación infrarroja que pueden afectar a la medida, por lo que no se debería medir, por ejemplo, a la luz directa del sol o cerca de una bombilla caliente. Las luces frías, como la producida por LED (light emitting diode) o por neones, no tienen este problema ya que convierten la energía usada en luz visible y no en radiación infrarroja. Por otro lado, las corrientes eléctricas pesadas causan fuertes campos magnéticos, los cuales pueden causar una distorsión considerable en la imagen térmica.

2.2.2 Tecnología de los Biosensores Ruminales

El rumen, junto con el retículo, omaso y abomaso forman los 4 estómagos de los rumiantes (Figura 2.5). En un rumiante adulto, los 4 estómagos pueden llegar a ocupar hasta el 75% de la cavidad abdominal y, junto con su contenido, representar cerca del 30% del peso vivo del animal (Church, 1979; Hungate, 1966). La fermentación microbiana de los alimentos se produce fundamentalmente en el retículo-rumen, y su ambiente (temperatura, pH y presión), se ve afectado por muchos factores entre los que destacan el consumo de alimento y agua, la rumia, y la producción y absorción de los metabolitos microbianos, fundamentalmente ácidos grasos volátiles (AGV). La fermentación de los alimentos en el retículo-rumen provoca la disminución del pH y el aumento de la temperatura, mientras que la absorción de AGV del rumen y la entrada de la saliva, poderoso tampón rico en bicarbonato y fosfato (pH 8.2), producen el aumento del pH ruminal. Por otro lado, la ingesta de los alimentos y de agua provocan una disminución de la temperatura.

Un pH ruminal diario entre 5.6–6.1 unidades proporciona un entorno óptimo para la digestión (Wales et al., 2004). De Veth y Kolver (1999) indicaron que la digestibilidad de la materia seca se optimiza a pH 6.35 y que cuando el pH ruminal es <5.8 se reduce la digestión. Beauchemin (2007) también afirma que un pH 5.8 causa una disminución en la digestión de la fibra y en la eficiencia de la alimentación en vacas.

Figura 2.5 Componentes del estómago y flujo de digesta en los rumiantes.



El tiempo medio de retención en el retículo-rumen varía de 10-24 h para el agua y los elementos solubles, mientras que aquellos insolubles de alta o baja digestibilidad, poseen una vida media aproximada en el rumen de 30-50 h, respectivamente (Church, 1979; Hungate, 1966).

2.2.2.1 Métodos para Medir el pH Ruminal

Diferentes técnicas pueden ser utilizadas para medir el pH ruminal en diferentes situaciones. En general, para acceder al retículo-rumen, se utilizan sondas gástricas ruminales o la ruminocentesis, tanto en condiciones de campo como experimentales (Garrett et al., 1999; Duffield et al., 2004). En investigación se utilizan normalmente animales canulados para la medición directa del pH ruminal.

El uso de sondas ruminales fue desarrollado para recoger líquido ruminal a través de la boca, pasando por el esófago hasta el rumen (Geishauser, 1993). Sin embargo, el procedimiento de inserción es laborioso, el animal debe ser inmovilizado durante el procedimiento y, si ocurre alguna obstrucción durante la extracción del contenido ruminal, es necesario retirar la sonda y volver a introducirla. Además, el pH ruminal medido mediante sondas es más alto que el pH medido por rumenocentesis o tomado la muestra a través de una cánula ruminal, debido a la contaminación por la saliva. (Geishauser, 1993; Duffield et al., 2004).

La rumenocentesis permite recoger líquido ruminal mediante aspiración directa con una aguja introducida en el rumen a través de la piel, cerca de la última costilla en el lado izquierdo del animal (Nordlund et al., 1994). La dificultad mayor de esta técnica es la necesidad de un operador entrenado, visto que puede conducir a un aumento indeseado del pH por la presión negativa de aspiración en la jeringa. Además, existe riesgo de peritonitis y limitaciones en la práctica pues no se deben realizar repetidas tomas en el mismo animal (Duffield et al., 2004).

La técnica más utilizada en investigación es la de la cánula ruminal implantada permanentemente en el rumen por medio de cirugía, lo que permite muestreos ruminales repetidos. Sin embargo, la cánula no es práctica para ser utilizada en condiciones de campo (Garrett et al., 1999).

Todas las técnicas descritas tienen limitaciones inherentes, ya que además de las objeciones de alteración del comportamiento o del bienestar animal, sólo indican el pH ruminal en el momento de la toma de muestra. Además, el estudio de la variación del pH ruminal en el tiempo, requiere un muestreo regular a intervalos cortos entre muestras, lo que necesita de mucha mano de obra. Por otro lado, las distintas técnicas pueden producir variaciones de los resultados dependiendo de la habilidad de los operadores, así como del lugar físico de toma de las muestras dentro del retículo-rumen (Duffield et al., 2004). Por lo tanto, se necesitan técnicas menos invasivas medir el pH ruminal de forma continua, sin interferir en el comportamiento del animal.

2.2.2.1.1 Medidores de pH ruminal

El primero intento para medir continuamente el pH ruminal lo realizó Smith (1941) que describe la medición *in vivo* del pH (3 mediciones al día por un periodo 5 d), con la ayuda de un pHmetro Beckman con un electrodo de vidrio. Más tarde Lampila (1955) y Matcher (1957) midieron el pH de forma continua en ganado bovino y ovino, respectivamente, mediante el uso de electrodos de vidrio en animales canulados, conectados a través de un cable a un pHmetro situado fuera del rumen.

En los últimos años, la monitorización del pH ruminal se ha automatizado con el desarrollo de los sistemas telemétricos. Las nuevas tecnologías mediante el uso de biosensores ruminales, tienen la ventaja de posibilitar un muestreo a intervalos repetidos o incluso la medida continua del pH (Enemark et al., 2003; Penner et al., 2006 y 2009; Alzahal et al., 2007b; Mottram et al., 2008; Kaur et al., 2010; Phillips et al., 2010; Zosel et al., 2010; Gasteiner et al., 2012; Sato et al., 2012; Lohölter et al., 2013) y de la temperatura (Ipema et al., 2008; Alzahal et al., 2009; Cooper-Prado et al., 2011; Rose-Dye et al., 2010) ruminal a través de la utilización de bolos ruminales. Los bolos permiten al animal moverse libremente y sin molestias, con o sin la utilización de cánulas ruminales.

Sonda telemétrica para la monitorización continua de pH ruminal/Dinamarca La utilización de dos sondas específicas para medir el pH en el retículo del ganado fue inicialmente realizada en vacunos canulados a partir de sondas diseñadas para animales marinos (Enemark et al., 2003). Las sondas contienen un micro electrodo y un electrodo de referencia con un sistema compensador de presión (permite la limpieza constante en todas las uniones de la sonda), minimizando el riesgo de contaminaciones del electrodo de referencia durante un máximo de 10 d. Además las sondas llevan acoplado un sensor de temperatura, combinado a un radio transmisor que permite la transmisión y almacenamiento de los datos en un ordenador.

Sistema de medida de pH de Lethbridge Research Centre; LRCpH/Canadá. Es un sistema sumergible que puede ser mantenido en el rumen durante al menos 72 h sin efectos adversos en la precisión y la fiabilidad (Penner et al., 2006). Presenta una correlación elevada ($r = 0.98$) con los valores de pH medidos de forma manual mediante cánulas en vacas lecheras. Estos sensores deben ser retirados del rumen 1 vez al día para calibración y descarga

de los datos, durante cuyo tiempo deben mantenerse a temperatura de 39°C, a fin de evitar una descompensación de la temperatura, antes de retornar al rumen.

Sistema de medida pH para pequeños rumiantes; SRS/Alemania. Evaluado por (Penner et al., 2009) para la medida continua en ovejas. El sistema consiste en un sensor de pH y temperatura ruminal, fabricado por Dacor (Escondido, CA). En los dos experimentos realizados, el periodo de medida fue de 3 h. La correlación con los valores manuales fue elevada ($r = 0.97$) en ambos experimentos. El procedimiento de calibración y descarga de los datos es similar al LRCpH descrito arriba.

Sistema de registro continuo de pH/Canadá. Se trata de un electrodo de pH, manufacturado por Omega Engineering (Stamford, CT, US), combinado con registrador de datos (AlZahal et al., 2007b). El registrador se fija mediante una correa ajustable alrededor del abdomen del animal, permitiendo así su movilidad durante la adquisición de los datos. El electrodo se introduce en el rumen y se conecta a través de un cable de 0.5 m con el registrador. El registrador puede almacenar hasta un total de 13.000 valores de datos de pH y en el experimento se registraron valores de pH cada 10 s en un total de 3 d, necesitando descarga de datos durante el experimento. Además, las calibraciones se realizan diariamente para eliminar desplazamiento del pH. El sistema presenta una correlación alta ($r = 0.88$) entre los datos transmitidos y las muestras de recogidas manualmente a través de una cánula,

Bolos con sistema de telemetría inalámbrica e-Cow/Escocia. Este sistema utiliza tecnología de radio frecuencia inalámbrica para transmitir los datos registrados por un bolo equipado con sensores hasta el receptor, situado cerca del animal, y de éste hasta un ordenador (Mottram et al., 2008). El objetivo del sistema es mantener una medición precisa de pH (± 0.2 unidades) durante 42 d. Segundo los autores, los datos muestran una estrecha correlación entre la sonda de referencia y las medidas del bolo.

Bolos para medida continua del pH, temperatura y presión ruminal/Australia. Se trata de una versión de bolo comercial, desarrollada a partir de un sensor ISFET para medir el pH, temperatura y presión (Kaur et al., 2010). Los valores de correlación con las muestras manuales tomadas mediante cánulas en carneros fueron bajos. Por otro lado, Lohölter et al. (2013) han utilizado un sistema sucesor del bolo utilizado por Kaur et al. (2010) en vacas canuladas en Alemania durante 8 d y con transmisión a cada 5 min, con resultados satisfactorios.

Datalogger and Transponder Well Cow Rumen pH; WCpH/Australia. Utiliza el mismo bolo que el sistema de Mottram (2008) con más tiempo de uso (Philips et al., 2010). En un experimento realizado en bovino durante 70 d y con transmisión de datos cada 15 min presentó una elevada correlación ($r = 0.93$) entre los datos transmitidos y los valores de las muestras ruminales colectadas manualmente a través de una cánula.

Sonda de medida continua de pH/Alemania. En este caso, la sonda de pH y el sensor de temperatura están acoplados en una única placa (Zosel et al., 2010). El sistema de transferencia de datos se realiza mediante un radio transmisor a una distancia máxima de 3 m. Durante un experimento de 14 d de medición en el rumen, hubo un desplazamiento <0.2 unidades de pH.

Sonda inalámbrica para transmisión de datos/Austria. Sistema de monitorización del pH y temperatura ruminal desarrollado por Gasteiner et al. (2009, 2012) consistente en una sonda que puede ser administrada por vía oral (210 g). Los datos son almacenados en un chip de memoria durante un periodo hasta 40 d y pueden ser enviados mediante radio frecuencia a un receptor externo. El sistema presenta una elevada correlación ($r = 0.99$) entre los datos transmitidos y las muestras recogidas manualmente a través de una cánula ruminal.

Sistema de radio transmisión para medición de pH/Japón. El sistema consta de un sensor de pH inalámbrico, un receptor, un transmisor, y un ordenador con un software propio (Sato et al., 2012). El sensor tiene forma de bolo (184 g), destinado a ser aplicado por vía oral, y consta de un electrodo de pH de vidrio, una unidad de procesamiento, un circuito de radio frecuencia y una batería (3.6 V, 1700 mA). El sistema permite registrar el pH ruminal continuamente con precisión, con una correlación entre los datos transmitidos y las muestras colectadas manualmente elevada ($r = 0.99$).

2.2.2.1.2 Medidores de temperatura ruminal

Bolo con sensor de temperatura/Países Bajos. Ipema et al. (2008) utilizaron un sistema de radiofrecuencia con sensor de temperatura y procesador. Sin embargo, la transmisión de datos del bolo ruminal se vio afectada por la posición del animal. La temperatura se midió a cada minuto durante 60 h y se almacenó en la memoria interna del procesador. La pérdida en la transmisión fue sin embargo de aproximadamente el 50%.

Bolo radiotelemétrico RTB/Canadá. Utilizado por AlZahal et al. (2009), el sistema consiste en un bolo ruminal, administrado por vía oral, y vinculado a un sistema de adquisición de datos, dos antenas, un sistema receptor/transmisor de radio frecuencia, y un ordenador equipado con un programa adecuado para registrar los datos.

Bolo temperatura/Oklahoma. Cooper-Prado et al. (2011) y Rose-Dye et al. (2010) han utilizado el mismo bolo que AlZahal et al. (2009); en un experimentos de 10-17 d y con transmisión cada 1-15 min con valores de transmisión de aproximadamente un 90%.

Actualmente, 3 empresas ofrecen en el mercado bolos ruminales de tamaño medio, con sensores para medir el pH y temperatura ruminal (Kahne, SmaXtec y WellCow), destinados a ser aplicados por vía oral en bovinos. Todos ellos presentan tecnología inalámbrica, batería, memoria de almacenamiento, así como transmisión y recepción de datos a través de radio frecuencia. SmaXtec y WellCow usan una tecnología con electrodo de vidrio y sus bolos pueden almacenar datos durante 75 y 120 d, respectivamente si se registran los valores cada 15 min. Kahne, desarrolló bolos con sensor ISFET (sensores electroquímicos basados en estructuras de silicio, con baja repetibilidad comparados con electrodos de vidrio), con una precisión de ± 0.06 unidades de pH. Esta tecnología fue evaluada por Kaur et al. (2010) en carneros canulados, presentando una correlación baja respecto a las muestras de pH manuales ($r = 0.46$). Posteriormente, la empresa desarrolló nuevos bolos sustituyendo los electrodos por otros de nuevo diseño con membrana de vidrio que presentan una precisión de ± 0.02 unidades de pH y puede almacenar datos cada 15 min durante 123 d. Los sensores fueron evaluados en vacas canuladas (Lohölter et al., 2013).

Tabla 2.1. Cuadro comparativo de los sensores ruminales de pH y/o temperatura.

Referencia	Ojetivo	Toma de datos ¹	Características	Fabricante
Enemark (2003), Dinamarca.	Medida continua del pH ruminal. (objetivo inicial: pH gástrico de animales marinos).	8 d @ 30 s (23.040)	Tamaño: cable de 1.3 mm o.d. y 3 m de largo. pH: 0-14 (± 0.03) Temp.: 15-50°C Calibración diaria	Microelectrodo: modelo MI-506, Microelectrodes, Bedford (EEUU). Registrador de datos: Earth & Ocean Technologies, Kiel (Alemania). Software: HG 2.0, Jensen Software Systems, Laboe (Alemania).
Penner (2006), Canadá.	Sistema de medición de pH sumergible.	3 d @ 3 s (86.400)	Tamaño: 30 × 90 mm pH: 0-12 (± 0.03) Temp.: 0-50°C Calibración diaria	Electrodo de pH: modelo S650-CDHF, Sensorex, Garden Grove, CA (EEUU) Registrador de datos: modelo M1b-pH-1KRTD, Dascor, Escondido, CA (EEUU).
AlZahal (2007b), Canadá.	Sistema continuo de toma de datos de pH ruminal con movilidad de los animales (Objetivo inicial: aguas residuales).	3 d @ 10 s (25.920)	Tamaño: 25 × 152 mm (total 190 × 590 mm). pH: 0-14 Temp.: 0-80°C (± 0.01)	Electrodo pH: Omega Engineering, Stamford, CT (EEUU). Registrador de datos y software: Monarch Instrume Amherst, NH (EEUU). PDA software: Palm Inc., Sunnyvale, CA (EEUU).
Ipema (2008), Holanda.	Medida de temperatura corporal por medio de un bolo ruminal.	2.5 d @ 1 min (3.600)	Tamaño: 36 × 106 mm Peso: 106 g Precisión: ± 0.5 °C	Croeelbow Technology, Milpitas, CA (EEUU). Antena, batería y sensor de temperatura (Mica2).
Mottram (2008), Escocia.	Medición de pH ruminal.	42 d @ 15 min (4.032)	Tamaño: 32 × 145 mm Peso: 240 g pH: 4-7 (± 0.3)	Well Cow WCpH, Midlothian, Escocia (UK). Software propio
Penner (2009), Alemania.	Sistema continuo de medición de pH ruminal para pequeños rumiantes, sin necesidad de cánula.	3 h @ 30 s (360)	Tamaño: 20.6 × 138 mm Peso: 245 g pH: 0-14 (± 0.2) Temp.: 0-50°C (± 0.2)	Sensor de pH: modelo 971819, Dascor, Escondido, CA (EEUU). Sensor de temperatura: modelo SRL-T6, Dascor, Escondido, CA (EEUU). Registrador de datos y software: Dascor.

AlZahal (2009), Canadá.	Comparación de temp. y pH ruminal, predecir pH rumen.	4 d @1 min (5.760)	Tamaño: 35 × 85 mm Peso: 120 g Precisión: ±0.28 °C	Sistema de adquisición: SmartStock, LLC, Pawnee, OK (EEUU).
Rose (2010), EEUU.	Diagnóstico precoz de la enfermedad respiratoria y la diarrea viral bovina (BVD).	17 d @ 1 min (24.480)	Tamaño: 35 × 85 mm Peso: 120 g Precisión: ±0.28 °C	Sistema de adquisición: SmartStock, LLC, Pawnee, OK (EEUU).
Cooper-Prado (2011), EEUU.	Detección de parto y celo en ganado bovino.	10 d @ 15 min (960)	Tamaño: 35 × 85 mm Peso: 120 g Precisión: ±0.28 °C	Sistema de adquisición: SmartStock, LLC, Pawnee, OK (EEUU).
Philips (2010), Australia.	Comparar datos WCpH y muestras manuales de pH.	70 d @ 15 min (6.720)	Tamaño: 32 × 145 mm Peso: 240 g pH: 4-7 (±0.3)	Well Cow WCpH, Midlothian, Escocia (UK)
Zosel (2010), Alemania.	Sistema para medición continua del pH ruminal.	14 d @ 1 min (20.160)	Tamaño: 36 × 195 mm Precisión pH: ±0.05	Intitute of Research Meinsberg Kurt-Schwabe, (Alemania). Transmisor (RT868F5).
Gasteiner (2009, 2012), Austria.	Medición de pH ruminal.	40 d @ 10 min (345.600)	Tamaño: 35 × 132 mm Peso: 210 g pH: 0-14 (±0.2) Temp.: 25-50°C (±0.2)	Bolo SX-1042, SmaXtec Animal Care, Graz, (Austria). Software: SmaXtec pH Transmisor/receptor: SmaXtec pH
Sato (2012), Japón.	Medición y transmisión continua del pH ruminal.	15 d @ 10 min (129.600)	Tamaño: 30 × 145 mm Precisión pH: ±0.2	Sistema de radio transmisor/receptor: Software: (Y-Cow-S)
Kaur (2010), Australia.	Medición continua del pH y temp. ruminal.	10 d @ 20 min (43.200)	Tamaño: 27 × 145 mm Peso: 70 g pH: 4-8 (±0.02) Temp.:0-45°C (±0.8)	Sistema completo: Kahne Ltd, Auckland (NZ).
Lohölter (2013), Alemania.	Medición continua de pH y temp. ruminal, según la localización y alimentación.	8 d @ 5 min (2.304)	Tamaño: 27 × 145 mm Peso: 70 g pH: 4-8 (±0.02) Temp.:0-45°C (±0.8)	Sistema completo: Kahne Ltd, Auckland (NZ).

¹ días @ intervalo (total de datos).

CAPÍTULO 3: OBJETIVOS

CAPÍTULO 3

OBJETIVOS

La presente tesis tiene por objeto obtener resultados prácticos sobre la utilización de nuevas tecnologías para la medida de la variación de la temperatura corporal y de las condiciones ruminales, tanto para detección de estados patológicos, como para evaluar los efectos de condiciones ambientales extremas en ganado ovino y caprino.

Los objetivos específicos fueron:

- 3.1 Evaluar el uso de la termografía de infrarrojos para la detección precoz de infecciones intramamarias (mastitis) en condiciones prácticas, así como en el caso de una infección aguda simulada mediante la infusión de endotoxina de *E. coli*, en la ubre de 2 razas de ovejas lecheras.
- 3.2 Evaluar el uso de biosensores de pH y temperatura ruminal para la medida continua de los efectos de condiciones ambientales extremas de temperatura y de alimentación en cabras lecheras no-lactantes.
 - 3.2.1 Comparación de los efectos en condiciones de neutralidad o de estrés térmico.
 - 3.2.2 Comparación de raciones con una relación concentrado:forraje del 50:50% (sobre materia seca) y de los efectos de la adición de aceites funcionales (Oligobasics).
- 3.3 Determinar la relación entre la temperatura y pH ruminal, mediante el uso de modelos matemáticos y comparar el uso de regresión logística y la distribución normal acumulativa a efectos de predicción.

CAPÍTULO 4:

USO DE LA TERMOGRAFÍA DE INFRARROJOS PARA DETECTAR MASTITIS EN OVEJAS LECHERAS

CAPÍTULO 4

USO DE LA TERMOGRAFÍA DE INFRARROJOS PARA DETECTAR MASTITIS EN OVEJAS LECHERAS

4.1 CALIBRACIÓN DE LA CÁMARA DE TERMOGRAFÍA INFRARROJA

Se adquirió una cámara termográfica de tipo medio (IRI 4010, Irisys. Northampton, UK) con unas características técnicas se han resumido en la Tabla 4.1.

Tabla 4.1. Características de la cámara termográfica IRI 4010 de Irisys.

Item	Valor de referencia
Rango de temperatura	-10 a +250 °C
Resolución	0.1 °C
Precisión	±0.15 °C
Campo de visión (FOV)	20° × 15°
Zoom	× 2
Emisividad (0.2-1.0)	0.98
Resolución del detector	160 × 120 pixels
Dimensiones	230 × 120 × 110
Peso	750 g

El proceso de calibración fue realizado previamente por el fabricante (Irisys, Northampton, UK), en el momento de la compra y con garantía durante un periodo de utilización de 1 año o 550 h de uso. Para ello se utilizó un equipo de radiación de infrarrojos con las propiedades de un cuerpo negro. El proceso se llevó a cabo en un laboratorio acreditado, en condiciones controladas de temperatura y humedad.

Sin embargo, para poder llevar a cabo las mediciones en animales utilizando la cámara de infrarrojos, fue necesario adaptar algunos parámetros, de acuerdo con lo descrito en la Sección 2.2.1.4.

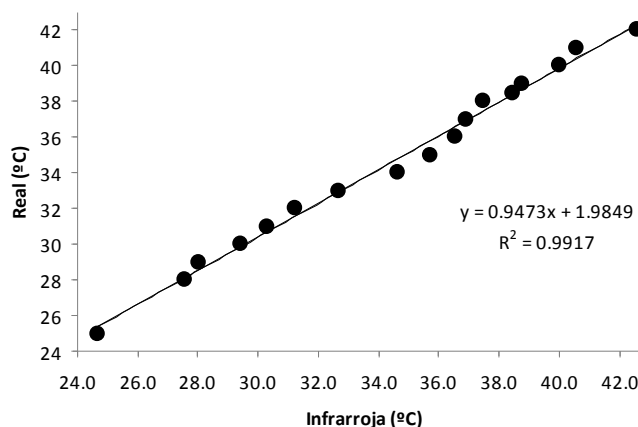
En primer lugar se configuró la emisividad por medio de la reflexión de un material de referencia. En este caso consistió en cinta negra ("cinta de calibración") con una emisividad conocida (en este caso cercana a 1). La cinta se colocó en la superficie de un objeto te

temperatura conocida para que adquiriera la temperatura del objeto y se determinó la temperatura de la cinta. Al usar $\varepsilon = 1$, y tener la misma temperatura que la superficie del objeto, se modificó la emisividad de la cámara para que la lectura de la temperatura de la cinta de calibración fuera igual a la temperatura del objeto de referencia.

En segundo lugar, se compensó la temperatura reflejada. Para ello se evitaron posibles fuentes de interferencia, de acuerdo con lo descrito en la Sección 2.2.1.4, y se realizaron medidas de objetos a temperaturas similares a la temperatura ambiente. Para ello se midió la temperatura ambiente con un termómetro y se ajustó la compensación de la temperatura reflejada en la cámara basándose en ese valor. También es posible realizar el ajuste por medio de un “pseudo radiador de Lambert”. Un radiador Lambert es un objeto que refleja la radiación incidente con una difusión óptima (misma intensidad en cualquier dirección). El material mas utilizado es una hoja de papel aluminio arrugada y alisada de nuevo, puesto que la lámina tiene una casi perfecta reflexión difusa. Se sitúa la hoja cerca del objeto a medir, con emisividad ajustada a 1, y como la cámara calcula la temperatura de la radiación incidente, se ajusta compensación en la cámara.

Con la finalidad de garantizar la exactitud de los datos, se realizaron comprobaciones con objetos de temperatura conocida, en nuestro caso agua medida con 3 termómetros de mercurio (Model colored liquid filler rod, Nahita Tecnologia, Beriáin, Navarra) Los resultados obtenidos fueron satisfactorios, tal como se presenta en la Figura 4.1.

Figura 4.1. Calibración de la cámara IRI 4010 con la temperatura del agua.



4.2 RELACIÓN ENTRE TEMPERATURAS: AMBIENTE, CORPORAL Y DE LA UBRE

Incremento significativo en la temperatura ambiente afecta la vasodilatación de los capilares subcutáneos, reduciendo la presión de los vasos. La vasodilatación permite que la sangre entre en contacto con la del ambiente; intercambiando calor con el mismo. Cuando la temperatura ambiente está en el rango de la del cuerpo (Figura 2.1), la piel pierde calor por evaporación (sudor) para mantener su temperatura corporal (homeotermia) entre otros factores. Al contrario, el efecto de la vasoconstricción, disminuye el flujo de sangre local y contribuye al enfriamiento de la zona afectada.

En relación a la piel de la ubre, distintos autores indican que la temperatura corporal y de la ubre siguen un patrón de ritmo circadiano durante el día (Berry et al., 2003; Piccione and Caola, 2003; D'Alterio et al., 2011).

4.3 THERMOGRAPHIC VARIATION OF THE UDDER OF DAIRY EWES AT EARLY-LACTATION AND FOLLOWING AN *E. COLI* ENDOTOXIN INTRAMAMMARY CHALLENGE AT LATE-LACTATION *(Variación de imágenes termográficas de las ubres de ovejas lecheras al inicio de lactación y después una challenge intramamaria con endotoxina E. coli al final de lactación)*

Resumen

Un total de 83 ovejas lecheras en lactación (Manchega, n = 48; Lacaune, n = 35) fueron utilizadas en 2 experimentos consecutivos con la finalidad de evaluar la capacidad de la termografía infrarroja (IRT) para detectar infecciones intramamarias (IMI) por medio de la medida de la temperatura de la piel de ubre (UST). En el primer experimento, las ovejas se ordeñaran dos veces al día y las imágenes de IRT de las ubres fueran tomadas antes y después del ordeño a los 46 y 56 días de lactación (DIM). La producción de leche fue de 1.46 ± 0.04 L/día, como media. La detección de la IMI se realizó mediante cultivo bacteriano estándar por media ubre a los 15, 34 y 64 DIM. Veintidós ovejas fueron clasificadas como IMI en al menos media ubre, siendo el resto sanas (142 sanas y 24 mitades con IMI, respectivamente). Cuatro mitades de ubres presentaron mastitis clínica. No se detectaron diferencias en la UST debidas

a IMI (sana vs. IMI), así como tampoco entre lados de la ubre (sana vs. sana), siendo 32.94 ± 0.04 °C como media. Sin embargo, se detectaron diferencias ($P < 0.01$) en UST para la raza (Manchega – Lacaune = 0.35 ± 0.08 °C), momento del ordeño (antes – después = 0.13 ± 0.11 °C) y en el horario del ordeño (mañana – tarde = 0.79 ± 0.07 °C). La UST aumentó linealmente con la temperatura ambiente ($r = 0.88$). En el experimento 2, se estudió la respuesta de la UST ante una challenge de endotoxina intramamaria de *E. coli* O55:B5 (5 mg /oveja) en 9 ovejas Lacaune sanas, ordeñadas una vez al día a finales de lactación (0.58 ± 0.03 L/d; 155 ± 26 DIM).

Las ovejas fueron asignadas en 3 grupos equilibrados de 3 ovejas. Los tratamientos se aplicaron por media ubre después del ordeño. Los tratamientos fueron: 1) control (C00, ambas mitades de la ubre no tratados), 2) media ubre tratada (T10 y C01, una media ubre infundida con endotoxina y el otro sin tratar, respectivamente), y 3) medias la ubre tratadas (T11, ambas mitades de la ubre infundidas con la endotoxina). Temperatura del cuerpo (vaginal) y UST, producción de leche y cambios en la composición de leche, fueron monitoreados por media ubre en diferentes intervalos de tiempo (2 a 72 h). Primeros signos locales y sistémicos del IMI se observaron a las 4 y 6 horas después de la challenge, respectivamente. Para todos los tratamientos, la UST aumentó después de la challenge, alcanzando un máximo a las 6 h en T11 (la cual difiere de C00, C01 y T10, $P < 0.01$) y disminuyó a partir de entonces, sin diferencias por tratamiento. Temperatura vaginal y el recuento de células somáticas (RCS) en la leche se incrementaron 6 h después de la challenge, mientras que el contenido de lactosa disminuyó, en las medias ubres infundidas con *E. coli* ($P < 0.01$). Efectos de la endotoxina en valores de lactosa y de RCS fueron detectables en las medias ubres hasta 72 h después de la infusión con *E. coli*. En conclusión, a pesar de la precisión de la cámara (± 0.15 °C) y el SEM obtenido en las medidas de UST (± 0.05 a ± 0.24 °C), no fue posible discriminar entre las medias ubres sanas e infectadas (subclínica y clínica) en ovejas lecheras.

Abstract

A total of 83 lactating dairy ewes (Manchega, $n = 48$; Lacaune, $n = 35$) were used in 2 consecutive experiments for assessing the ability of infrared thermography (IRT) to detect intramammary infections (IMI) by measuring udder skin temperatures (UST). In Exp. 1, ewes

were milked twice-daily and IRT pictures of the udder taken before and after milking at 46 and 56 DIM. Milk yield was 1.46 ± 0.04 L/d, on average. Detection of IMI was done using standard bacterial culture by udder half at 15, 34 and 64 DIM. Twenty-two ewes were classified as having IMI in at least one udder half, the others being healthy (142 healthy and 24 IMI halves, respectively). Four IMI halves had clinical mastitis. No UST differences were detected by IMI and udder side, being 32.94 ± 0.04 °C, on average. Nevertheless, differences ($P < 0.01$) in UST were detected by breed (Manchega - Lacaune = 0.35 ± 0.08 °C), milking process moment (before - after = 0.13 ± 0.11 °C) and milking schedule (a.m. - p.m. = 0.79 ± 0.07 °C). The UST increased linearly with ambient temperature ($r = 0.88$). In Exp. 2, the UST response to an *E. coli* O55:B5 endotoxin challenge (5 µg/udder half) was studied in 9 healthy Lacaune ewes milked once-daily at late-lactation (0.58 ± 0.03 L/d; 155 ± 26 DIM). Ewes were allocated into 3 balanced groups of 3 ewes to which treatments were applied by udder half after milking. Treatments were: 1) control (C00, both udder halves untreated), 2) half udder treated (T10 and C01, one udder half infused with endotoxin and the other untreated, respectively), and 3) treated udder halves (T11, both udder halves infused with endotoxin). Body (vaginal) temperature and UST, milk yield and milk composition changes, were monitored by udder half at different time intervals (2 to 72 h). First local and systemic signs of IMI were observed at 4 and 6-h post-challenge, respectively. For all treatments, UST increased after the challenge, peaking at 6 h in T11 (which differed from C00, C01 and T10; $P < 0.01$), and decreased thereafter without differences by treatment. Vaginal temperature and milk somatic cell count (SCC) increased by 6 h post-challenge, whereas lactose content decreased, in the *E. coli* infused udder halves ($P < 0.01$). Endotoxin effects on lactose and SCC values were detectable in the infused udder halves until 72 h. In conclusion, despite the accuracy of the camera (± 0.15 °C) and the SEM obtained for UST measures (± 0.05 to ± 0.24 °C), we were unable to discriminate between healthy and infected (subclinically or clinically) udder halves in dairy ewes.

4.3.1 Introduction

Early diagnosis of intramammary infections (IMI) is a relevant topic in the dairy industry due to its effects on milk production and treatment related costs. Animals respond to IMI locally (i.e., pain, heat, hardness, swelling) and systemically (i.e., antibody production, body

temperature), but the response may vary according to the infectious agent (Rebhun, 1995; McGavin et al., 2007). Thermal response to infection (fever) is a useful indicator in diagnosis which can be observed locally in most IMI cases (Rebhun, 1995).

Infrared thermography (IRT) is a non-invasive technique which allows the temperature of a surface to be measured without contact. The IRT can generate images of the amount of heat emitted by an object, which has been used to study the changes in udder surface temperature (UST) by IMI in dairy cows (Barth, 2000; Scott et al., 2000; Hovinen et al., 2009). Moreover, IRT was able to show changes in teat temperature according to milking parameters in dairy cows (Kunc et al., 2007; Vegricht et al., 2007) and dairy ewes (Murgia et al., 2008). Barth (2000) concluded that IRT showed promise for detecting clinical mastitis, although it was unlikely to be useful for subclinical mastitis detection.

Berry et al. (2003) reported daily variations in UST of dairy cows measured by IRT as a consequence of exercise, ambient temperature and circadian rhythm, concluding that UST can be predicted accurately and, the difference between actual and predicted temperature being useful for detecting mastitis. In this sense, Colak et al. (2008) and Polat et al. (2010) indicated that IRT had a predictive diagnostic ability similar to California mastitis test (CMT) in dairy cows. Reported UST changes as a result of the IMI-like process induced by infusing *E. coli* bacteria or endotoxin lipopolysaccharide in dairy cows, varied between 1.0 and 3.0 °C (Hovinen et al., 2008; Pezeshki et al., 2011) which fit in the range of the accuracy of most IRT cameras. Nevertheless, Hovinen et al. (2008) stressed that UST changes may be affected by the vasoconstriction of the peripheral blood vessels observed during many IMI episodes.

The aim of this study was to evaluate the use of IRT for the measurement of udder surface temperature changes produced by dairy sheep breed and machine milking, and to assess the use of IRT for detecting IMI naturally occurring and induced by *E. coli* endotoxin infusion, at early- or at late-lactation, respectively.

4.3.2 Material and Methods

The treatment procedures and animal care conditions were reviewed and approved by the Ethical Committee on Animal and Human Experimentation of the Universitat Autònoma de Barcelona (reference CEEAH 2011/1056).

4.3.2.1 Experiment 1

4.3.2.1.1 Animal and management conditions

A total of 83 lactating dairy ewes (Manchega, n = 48; Lacaune, n = 35) from the Experimental Farm of the “Servei de Granges i Camps Experimentals” (SGCE) of the UAB (Bellaterra, Barcelona, Spain), were used after parturition. Ewes were kept in a semi-confinement system, allowed to graze for 6-h daily in an annual Italian ryegrass prairie and supplemented indoors with alfalfa hay ad libitum (1.27 Mcal of NEL/kg and 20.1% CP; DM basis) and concentrate pellets at a flat rate of 0.8 kg/d (1.75 Mcal NEL/kg and 16.5% CP; DM basis) distributed in 2 portions at milking times. After the weaning of the lambs (d 35), the ewes were machine milked twice-daily (0800 and 1700 h) in a double-12 stall parallel milking parlor (Amarre Azul I, DeLaval Equipos, Alcobendas, Madrid, Spain) with a central high milk pipeline, 12 DeLaval SG-TF100 milking clusters and 12 MM25SG milk flow and recording units. Milking was performed at a vacuum of 40 kPa, 120 pulses/min and 50% pulsation ratio. The milking routine included cluster attachment (without udder preparation), machine milking and automatic cluster detachment (milk flow rate <0.1 L/min or milking time >3 min). Teat dipping with a iodine solution (P3-ioshield, Ecolab Hispano-Portuguesa, Barcelona, Spain) was done at the end of milking. Teat dipping was done after taking the IRT pictures on the experimental days.

4.3.2.1.2 Milk recording and sampling

Milk yield of individual ewes was recorded at 60 DIM. Udders and milk were clinically examined for IMI clinical signs (hypersensitivity, hardness, abnormal texture, swelling and hyperthermia) and for physical milk changes (i.e., milk clots, color and consistency changes) according to NMC (1999). Detection of IMI by bacterial culture of foremilk samples were performed by udder half at 15, 34 and 64 DIM.

Milk samples were taken out aseptically from each mammary gland before milking. Teats were dipped in a iodine solution (P3-ioshield), dried with disposable paper towels and dipped in ethanol 70% before sampling. The initial milk squirts were discarded and approximately 5 mL collected in sterile plastic cap tubes, preserved under refrigeration (4 °C) and processed on the same day. Milk samples were cultured using conventional methods and 0.01 mL were

streaked onto blood-agar plates (Agar Sangre 90 mm, Lab. Conda, Torrejón de Ardoz, Madrid) and incubated at 37 °C. Plates were examined for bacterial growth after 18, 24 and 48 h.

4.3.2.1.3 Udder skin temperature

The UST was measured using a handheld portable infrared imaging camera (IRI 4010, Irisys, Northampton, UK). The camera operated within 8 to 14 μm spectral band and ± 0.15 °C thermal resolution (accuracy). Before each measurement, the camera was adjusted for the ambient temperature conditions of each scanning (9 to 26 °C) to compensate the reflected temperature. The emissivity value was set to 0.98 according to the Irisys camera user's manual which is the value commonly used for measuring the skin temperature in humans and in dairy cow's udder (Hovinen et al., 2008).

The IRT pictures of each udder were taken immediately before and after milking at 46 and 56 DIM. Ewes were restrained in a standing position using the head locker of the milking parlor, and udder pictures were taken from a caudal view placing the camera on a tripod and at 0.5 m distance. Udders were free of debris or fecal materials. Infrared images were downloaded and the UST points analyzed with appropriate computer software (Irisys 4000 Series Imager v.1.0.0.17). Representative UST values of each udder half were obtained from the full udder IRT images (640×480 pixels) by selecting a rectangle of 55×40 pixels in the centre of the cisternal part of each udder half (Figure 4.2). Special care was taken to avoid the influence of heat from the groin, the leg and the median suspensory ligament as they showed higher temperatures than the rest of the udder. Mean UST for each udder half was obtained using a 4 \times zoom by averaging the temperatures recorded in the centre of each side of the selected rectangle.

Skin thickness of the udder was measured after p.m. milking in duplicate in a random sample of 10 ewes of each breed with healthy udders. With this aim, the width of a fold of udder skin in 2 positions at the middle line of the udder perineal region (escutcheon) were measured at the end of the experiment and approximately 4 h after milking using a stainless steel electronic digital calliper (Yicheng, Beijing, China).

4.3.2.2 Experiment 2

4.3.2.2.1 Animal and management conditions

Nine healthy primiparous Lacaune dairy ewes (60.2 ± 0.8 kg BW) at the end of lactation (155 ± 26 DIM and 0.58 ± 0.03 L/d) from the Experimental Farm of the SGCE were used. Ewes were maintained indoors in straw bedded pens (1 m²/ewe) and fed a mix of alfalfa and tall fescue hays (2:1) ad libitum and the same concentrate mixture (0.6 kg/d, as fed) used in Exp.1. Once-daily milking was conducted (0800 h) in a 12-stall milking parlor (Westfalia-Surge Ibérica, Granollers, Spain) equipped with recording jars (2 L \pm 5%) and a low milk pipeline. Milking was performed at a vacuum of 42 kPa, 120 pulses/min, and a 50% pulsation ratio. The milking routine included cluster attachment, machine milking, machine stripping before cluster removal, and teat dipping in a iodine solution (P3-ioshield).

No signs of IMI were detected in any udder half either by clinical examination or CMT (Insvet, Esplus, Huesca, Spain) of foremilk before the experiment. Absence of intramammary infections was also confirmed by bacterial culture as done in Exp. 1.

Ewes were assigned to 3 balanced groups of 3 ewes to which the experimental treatments were randomly applied.

4.3.2.2.2 Endotoxin challenge

Treatments consisted of intramammary challenges of *Escherichia coli* serotype O55:B5 endotoxin lipopolysaccharide (Sigma-Aldrich, St Louis, MO) for inducing an intramammary response similar to a mastitis-like process, and were: 1) control (C00, both udder halves untreated; n = 3 ewes), 2) half udder treated (T10 and C01, one udder half was endotoxin infused and the other half was untreated, respectively; n = 3 ewes), and 3) both udder halves treated (T11, both udder halves were endotoxin infused; n = 3 ewes).

A solution of 5 μ g/mL *E. coli* O55:B5 endotoxin in physiological saline (NaCl-0.9%; B Braun, Barcelona, Spain) was aseptically prepared and preserved in 1 mL sterilized vials under refrigeration (4 °C). The endotoxin challenge consisted of infusing 1 mL endotoxin solution (5 μ g/udder half) through the teat canal of the T10 (half udder) and T11 (both udder halves) ewe udders by using individual aseptic plastic cannulas (Mod. J-2, length 1 $\frac{1}{3}$ "

Jorgensen Laboratories, Loveland, CO) cut to 18 mm long and with 2.5 mm outside diameter at approximately 30 min after the morning milking.

4.3.2.2.3 Clinical observations and milk sampling

The experimental period lasted for 3 d in which the clinical and productive stages of the udder halves were monitored after the challenge. Systemic (body temperature and udder appearance) and local (redness, hardness and UST) signs of reaction to the endotoxin challenge were monitored at 1 h, every 2-h (2 to 12 h), every 12-h (12 to 72 h), and additionally at 25, 28, 32, 49 and 73 h post-challenge.

Body temperature (systemic sign of reaction) was measured vaginally at the above indicated hours using a clinical thermometer (Model mini color, ICO Technology, Barcelona, Spain; range, 32.0 to 43.9 °C; accuracy, ± 0.1 °C). Udders and milk were also subjected to physical examination for IMI according to Exp.1 procedures.

Milk yield was recorded and milk samples collected (for CMT, milk composition and SCC) by udder half during the pre-experimental week and, at each milking throughout the experiment (d 1 to 3). Additional milk samples were collected manually at 6, 24, 48 and 72 h post-challenge. For milk composition and SCC analyses, samples of approximately 50 mL were preserved with anti-microbial tablets (Bronopol, Broad Spectrum Micro-tabs II, D&F Control Systems Inc., San Ramon, CA) and kept at 4°C until processing. Both milk composition and SCC were determined in the interprofessional dairy laboratory of Catalonia (Allic, Cabrils, Barcelona, Spain), using an automatic somatic cell counter (Fossomatic 500, Foss-Electric, Hillerød, Denmark) previously calibrated for ewes milk.

4.3.2.2.4 Udder skin temperature

The UST was measured using the procedure described in Exp.1, taken a total of 17 IRT images from each ewe's udder immediately before and at different times after the challenge (same as for body temperatures). Images were obtained from the untouched udders, before udder examination and milk sampling to avoid stress induced hyperthermia (Bouwknicht et al., 2007).

4.3.2.3 Statistical Analyses

Data of both experiments were analyzed using the PROC MIXED of SAS v.9.1 (SAS Inst. Inc., Cary, NC) and variation factors compared by classes. The mixed model used for Exp.1 data contained the fixed effects of udder health (healthy and IMI), breed (Manchega and Lacaune), milking moment (before and after) and milking schedule (a.m. and p.m.), and the random effects of the ewe (1 to 83) and the error.

Model used in Exp. 2 contained the fixed effects of treatment (C00, T11, C01 and T10), time post-challenge (0 to 73 h), and the random effects of the ewe (1 to 9) and the error. Performance data before the endotoxin challenge were used as a covariate to correct for individual initial differences and results were presented as least squares means. Differences between least squares means were determined with the PDIFF option of SAS. Logarithmic transformations (\log_{10}) of SCC values were used in the statistical analysis. Pearson's correlations were used to determine the relationship between the studied variables. Significance was declared as $P < 0.05$, unless otherwise indicated, and tendencies were discussed at $P < 0.10$.

4.3.3 Results and Discussion

4.3.3.1 Experiment 1

4.3.3.1.1 Milk yield

Experimental ewes yielded 1.46 ± 0.04 L/d, on average, at 60 DIM. When classified according to the bacterial culture, subclinical IMI ewes yielded 12% less milk than the healthy ones, although the difference was not significant (1.37 ± 0.08 vs. 1.49 ± 0.06 L/d; $P = 0.212$). A lower milk yield was expected in the IMI ewes according to different authors (Viguier et al., 2009; Pezeshki et al., 2011), although the difference with the healthy ewes may have been reduced as a result of the low incidence of udder halves suffering subclinical mastitis (12.1%) and the compensatory milk yield of the contralateral udder half (Leitner et al., 2004).

4.3.3.1.2 Subclinical mastitis

From the 166 udder halves utilized, a total of 20 (12.0%) were classified as IMI by bacterial culture in at least 2 of the 3 tests made at 15, 34 and 64 DIM. The subclinical IMI ewes did not present signs of mastitis and their milk was apparently normal but showed high SCC ($>300 \times 10^3$ cells/mL, according to McDougall et al., 2001). Reported values of incidence of subclinical mastitis in dairy cows are also markedly greater than in ewes (Lam et al., 2013; 22 to 23%).

No differences in UST values were detected between healthy and subclinical IMI udders of the same ewes throughout the experiment, but the IMI udders tended to show slightly lower mean UST values than the healthy udders (33.13 vs. 33.61°C, respectively; SEM = ± 0.28 ; $P = 0.095$). These results are contrary to those of Martins et al. (2013) who reported greater UST values in subclinical mastitis than in healthy udders of Santa Inês ewes (37.46 vs. 37.05°C, respectively), although the number of ewes (healthy, 16; subclinical mastitis, 8), size of the udder (meat sheep) and the cleaning process (using warm water) may have conditioned the results. Moreover, no differences were reported by Martins et al. (2013) for total udder mean temperatures (36.30 vs. 36.06°C, respectively).

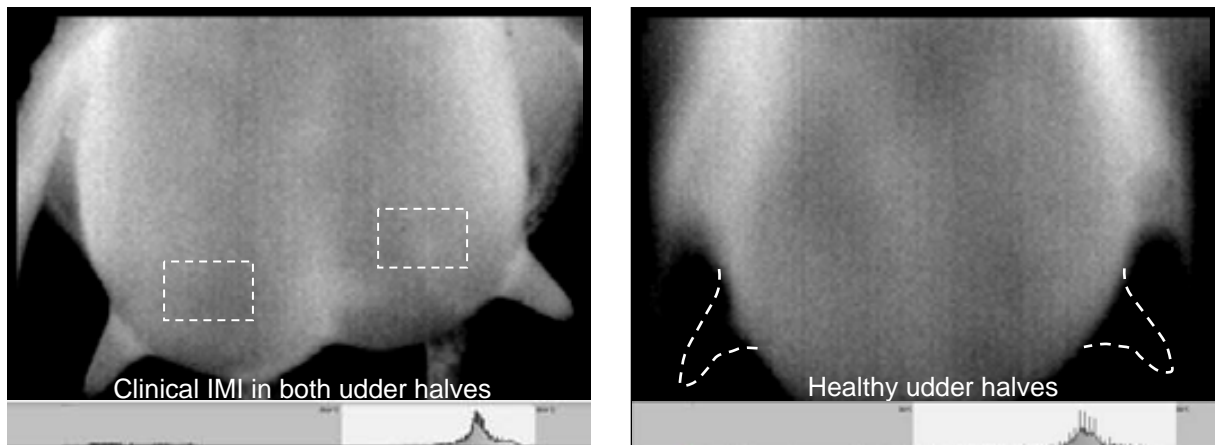
4.3.3.1.3 Clinical mastitis

A total of 4 udder halves (3 ewes, 3.6%) showed clinical mastitis and required antibiotic treatment. These IMI udders showed local and systemic mastitis clinical signs (severe swelling, tissue hardness and redness) and marked changes in milk appearance (flakes, watery and abnormal texture). Prevalence of clinical mastitis is generally not greater than 5% in dairy sheep (Berger et al., 2004) as observed in our data. Incidence of clinical mastitis is markedly greater in dairy cows when compared to dairy sheep, ranging between 28 and 33.5% quarter cases as reported in Canada (Olde Riekerink et al., 2008) and the Netherlands (Lam et al., 2013).

Mean UST values for clinical IMI varied largely and, on average, were slightly greater than for the healthy udder halves although they did not differ (33.51 vs. 33.47 °C, respectively; SEM = ± 1.13 ; $P = 0.972$). Infrared thermography images of the only ewe presenting a clinical IMI in both udder halves compared with a fully healthy udder are shown in Figure 4.2. High temperature pixels are shown by lighter grey. Martins et al. (2013)

reported lower UST values but no differences between clinical mastitis and healthy udders (36.67 vs. 37.05 °C; n = 13) which was considered as a response to the decreased blood flow which was a consequence of the mammary gland loss of function. Moreover, Hovinen et al. (2008) indicated that UST changes may be affected by the vasoconstriction of the peripheral blood vessels observed during IMI episodes, producing a decrease in skin temperature.

Figure 4.2 Infrared thermographic images of clinical intramammary infected udder halves (left) and healthy udder halves (right) of dairy ewes done in the milking parlor for an indoor ambient temperature ranging between 9.1 and 16.6 °C. Thermal histogram is shown under each image and udder skin temperature extreme values shown in brackets. Note that values are greater in the healthy udders.



4.3.3.1.4 Udder temperature variations factors

Table 4.2 summarizes the effects of the main factors considered in the study to explain the variation of UST values in the experimental ewes. Overall mean UST (32.94 ± 0.04 °C) was lower than the average body temperature reported for sheep (38.0 to 39.5 °C; Adams and McKinley, 2009) and it was affected by most of the studied factors (i.e., breed, milking schedule and milking moment; $P < 0.05$ to 0.001). Values of UST were lower in the Manchega compared to the Lacaune breed ewes ($P < 0.01$; Table 4.2), which agrees with their lower milk yield observed in our data for the healthy ewes (1.25 vs. 1.72 L/d; SEM = ± 0.97 ; $P < 0.001$). No previous data on the relationship of milk yield and UST has been reported. Moreover, no differences in udder skin fold thickness were detected between Manchega and

Lacaune ewes (15.82 ± 0.13 vs. 15.79 ± 0.07 mm, respectively; $P = 0.896$) but we noted that Manchega ewes had more frequently the presence of hair in their udders than Lacaune. According to Mitchell (2013), hair presence may have decreased the UST values and contributed to the breed differences above indicated.

Table 4.2 Effect of the experimental variation factors on the udder skin temperatures (UST, °C) of dairy ewes

Factor	Category 1	Category 2	SEM	Effect ($P =$)
Breed ¹	32.88	33.23	0.11	0.003
Milking schedule ²	32.66	33.45	0.06	0.001
Milking moment ³	32.99	33.12	0.05	0.014
Side of the udder ⁴	33.05	33.06	0.11	0.879
Status of udder ⁵	33.11	33.00	0.16	0.484

¹Factor classes: Breed (class 1, Manchega; class 2, Lacaune), milking schedule (class 1, a.m.; class 2, p.m.), milking moment (class 1, before; class 2, after), side of the udder (class 1, left, class 2, right) and health status of udder (class 1, healthy; class 2, subclinical IMI).

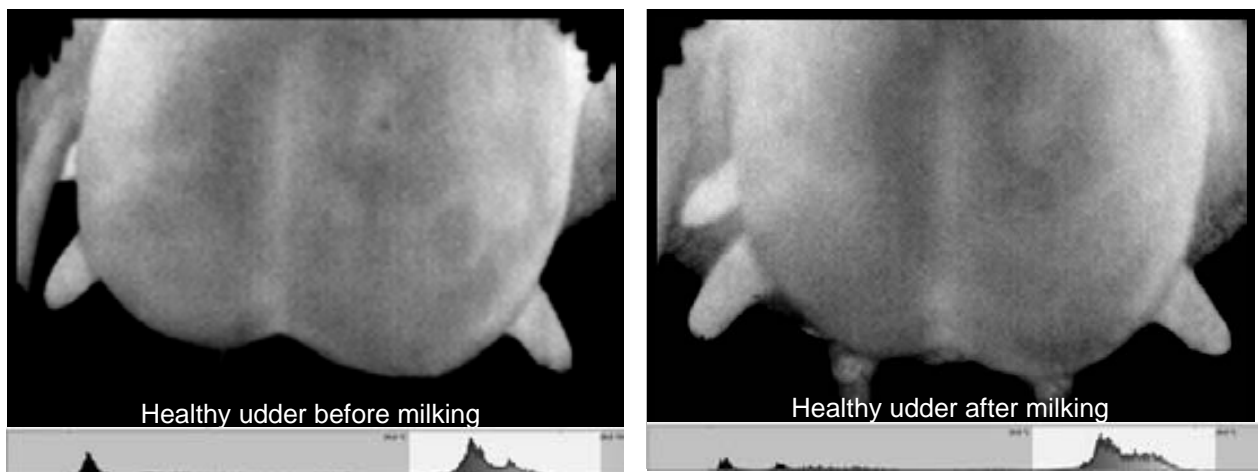
The UST values before milking were lower at the morning milking than at the afternoon milking ($P < 0.001$; Table 4.2), which may be related with the circadian rhythm of body temperatures, exercise and feeding behavior (Berry et al., 2003; Piccione and Caola, 2003; D’Alterio et al., 2011). Moreover, UST correlated with ambient temperature ($y = 0.37x + 28.4$; $r = 0.88$; $P < 0.001$). Indoor ambient temperature was 12.18 ± 0.74 °C on average, ranging between 9.1 and 16.6 °C during the experiment. Loughmiller et al. (2001) also reported a correlation ($r = 0.98$) between ambient temperature (10 to 32 °C) and body surface temperature measured by IRT in pigs; each 1 °C increment caused an increase of 0.40 °C in the body surface temperature of pigs

Additionally, UST values increased by effect of milking ($P < 0.05$; Table 4.2), which agreed with the conclusions of Kunc et al. (2007) and was attributed to the hyperemia by udder manipulation. Figure 4.3 shows the IRT images of the udder of the same ewe before and after milking. Nevertheless, Murgia et al. (2008) in sheep and Aljumaah et al. (2012) in camels reported a decrease in the temperature of the teats and the udder, measured by IRT, as a consequence of machine milking. Differences in the UST response to machine milking may

also be due to the operating vacuum and milk yield (Kunc et al., 2007). Vegricht et al. (2007) reported lower increments in UST in dairy cows by lower milking vacuums.

No effects were detected in our ewes in udder side and udder health status ($P > 0.05$; Table 4.2), allowing us to use pooled data and agreeing with the IMI data above discussed.

Figure 4.3 Infrared thermographic images of healthy udders of dairy ewes before (left) and after (right) milking done in the milking parlor for an indoor ambient temperature ranging between 9.1 and 16.6 °C. Thermal histogram is shown under each image and udder skin temperature extreme values shown in brackets. Note the presence of a supernumerary teat in the left udder half.



4.3.3.2 Experiment 2

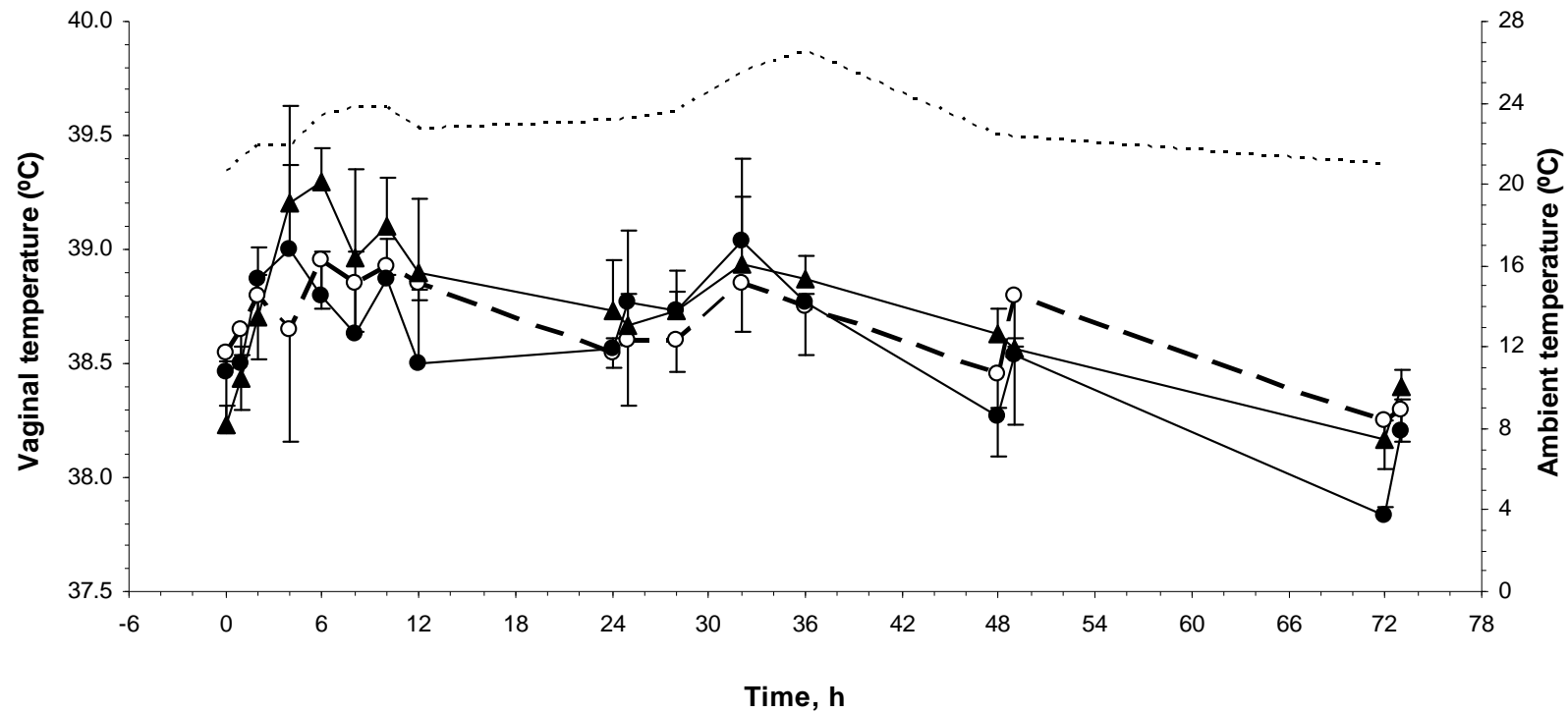
4.3.3.2.1 Clinical signs and body temperature

Local and systemic signs of IMI in the T10 and T11 mammary glands were clearly observed after endotoxin infusion despite the dose used by udder half (0.083 $\mu\text{g}/\text{kg}$ BW). None of the ewes had a severe reaction to the endotoxin challenge. The T10 and T11 ewes were calm after endotoxin infusion and did not present signs of pain or hypersensitivity, although 2 ewes of each treatment showed udders with moderate swelling and tissue hardness approximately 4 h after infusion. Clinical signs were similar to those observed in an acute IMI.

Body temperature, measured by vaginal temperature of the T10 and T11 ewes increased after endotoxin infusion (Figure 4.4), peaking at 4 to 6 h after the challenge. In parallel, vaginal temperature of C00 ewes slowly increased after milking likely ambient temperature and peaked 6 h after milking. Positive correlations of the vaginal temperature (x) with ambient temperature (y) were detected for the healthy ewes ($y = 0.072 x + 37.02$; $r = 0.55$; $P < 0.001$), indicating that the observed increased temperature was unlikely due to the IMI response and could be a consequence of the rise in ambient temperature, agreeing with data of Exp. 1. Vickers et al. (2010) validated the use of vaginal loggers to measure body temperature which has the advantage of not being affected by the presence of feces. Willard et al. (2007) also reported increased body temperatures after an endotoxin in dairy cows, but the authors did not correlate this with the increased ambient temperature also recorded in the experiment.

The endotoxin dose used in our experiment was low compared to those used in dairy cows, which ranged between 0.02 and 2.60 $\mu\text{g}/\text{kg}$ BW of *E. coli* O55:B5 (Hovinen et al., 2008; Willard et al., 2007; respectively), but was enough to induce dramatic changes in milk appearance (milk flakes and yellow color) 6 h after the challenge; the 3 T11 ewes showing abundant flakes in their milk. A higher dose was used by Scott et al. (2000) in dairy cows but no information is available on the *E. coli* serotype used. Udder swelling disappeared gradually and was hardly detectable 24 h after the challenge as reported in dairy cows (Scott et al., 2000).

Figure 4.4 Changes in vaginal temperature of dairy ewes submitted to an *E. coli* endotoxin lipopolysaccharide challenge at late-lactation. Treatments by udder half were: both udder halves untreated (○, C00, control), half udder treated (▲, T10 and C01, one udder half was LPS infused and the other half was untreated, respectively), and both udder halves treated (●, T11, both udder halves were endotoxin infused). Experimental details: *E. coli* challenge (▲), once-daily milking (▼) and ambient temperature in the barn (---). Values are means with SEM indicated by vertical bars.



4.3.3.2.2 Milk yield and composition

Regarding milk production, all groups of ewes decreased milk yield on the day of treatment, which may have been a consequence of the experimental management and isolation of the ewes from the flock on the day before (Sufka and Hughes, 1991). Nevertheless, in agreement with the IMI signs of the T10 and T11 infused ewes, a greater milk yield drop was observed in the endotoxin treated udder halves after infusion (Figure 4.5). On average, daily milk yield drop in the treated (T10 and T11) vs. the untreated (C00 and C01) udder halves at 24, 48 and 72 h post-challenge, were -33.1 ($P < 0.05$), -41.4 ($P < 0.001$) and -36.6% ($P < 0.001$) respectively, when compared to 0 h. All ewes increased milk yield at 48 h except the T10 ewes which steadied but recovered at 72 h. As a consequence C00 and C01 ewe groups recovered their initial milk yield before the challenge, while the T10 and T11 showed an incomplete recuperation after 72 h. Lehtolainen et al. (2003) reported a complete recovery of the udder of dairy cows on d 2 after the challenge, which was not observed in our results and may be a consequence of the involution stage of the mammary gland induced by the once-a-day milking at the end of lactation (Boutinaud et al., 2003).

Changes in milk components as a result of the endotoxin challenge varied according to the milk component considered (Table 4.3), being moderate in fat, protein and total solids and dramatic in lactose and SCC. The effect of endotoxin challenge on fat, protein and total solids contents were only significant 6 h after the challenge and no effects were detected in their corresponding daily milk yields, except in the total solid yield at 72 h which was showing the first signs of recovery (Table 4.3; $P > 0.05$). Lactose content dramatically decreased in the T01 and T11 groups 6-h after the challenge ($P < 0.001$), showing a nadir at 24-h and signs of recovery at 72-h, when compared to the control groups (Table 4.3). Similar effects were detected in lactose daily yield ($P < 0.05$). A decrease in lactose output was also reported by Leitner et al. (2004) in subclinical mastitis milk of dairy ewes, which was attributed to the local role of casein hydrolyzed peptides on the activity of mammary epithelial cells (Silanikove et al., 2000). Martins et al. (2013) also reported lower lactose levels in the milk of ewes with clinical mastitis, supporting the theory that the secretory tissue damage leads to a decrease in lactose biosyntheses. On the other hand, $\log_{10}\text{SCC}$ increased in the milk of the

endotoxin treated groups (13 to 26%, $P < 0.005$; Table 4.3) and stayed high during the experiment (Lehtolainen et al., 2003), the effect being consistent 72 h after the endotoxin challenge and with the decrease in milk lactose contents. These results confirm the adequacy of the endotoxin dose used in our ewes and the persistency of the mastitis clinical signs above discussed, agreeing with those reported by Hovinen et al. (2008) in dairy cows treated with a low dose of endotoxin.

Figure 4.5 Effect of the infusion of *E. coli* endotoxin lipopolysaccharide (LPS) on the milk yield of dairy ewes at late-lactation by half udder (○, untreated; ●, LPS infused). Treatments: both udder halves untreated (---, C00, control), half udders treated (— — —, C01, untreated udder half; — • —, T10, treated udder half) and both udder halves treated (— •• —, T11, both udder halves infused). Experimental details: *E. coli* challenge (▲) and once-daily milking (▼). Values are least squares means with SEM indicated by vertical bars.

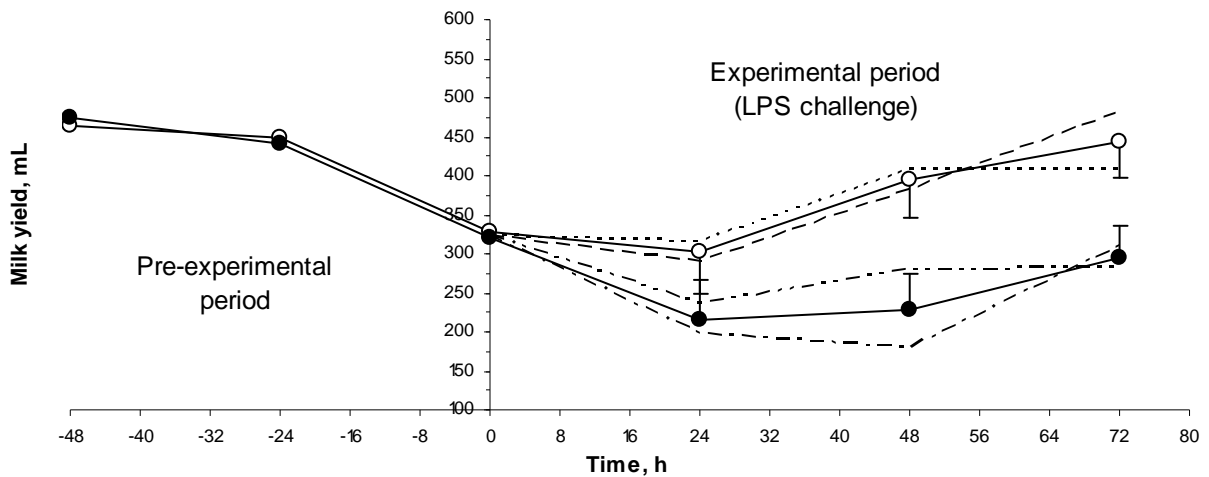


Table 4.3 Effect of the *E. coli* lipopolysaccharide (LPS) infusion treatments on milk composition by udder half of dairy ewes at the end of lactation.

Item	Time ² , h	Treatment ¹				SEM	Treatment effect (<i>P</i> =)
		Control		LPS infused			
		C00	C01	T10	T11		
Fat, %	6	9.82 ^{ab}	9.33 ^b	7.96 ^a	8.26 ^{ab}	0.34	0.084
	24	7.22	7.42	8.19	8.23	0.48	0.761
	48	6.46	5.40	9.54	7.56	0.57	0.173
	72	6.38	5.99	7.05	6.91	0.47	0.805
Fat yield, g/d	6	—	—	—	—	—	—
	24	22	21	17	18	2	0.619
	48	25	22	16	21	3	0.652
	72	24	29	23	20	2	0.117
Protein, %	6	6.04 ^b	5.80 ^{ab}	5.60 ^{ab}	5.55 ^a	0.06	0.044
	24	6.07	5.94	7.33	6.80	0.19	0.102
	48	6.03	6.02	7.89	6.60	0.23	0.154
	72	6.44	6.17	6.48	6.09	0.10	0.352
Protein yield, g/d	6	—	—	—	—	—	—
	24	20	17	14	14	2	0.500
	48	25	23	14	18	2	0.204
	72	26	31	24	18	2	0.053
Lactose, %	6	4.46 ^c	4.51 ^c	2.73 ^a	3.47 ^b	0.12	0.001
	24	4.29 ^c	4.48 ^c	2.02 ^a	2.92 ^b	0.10	0.003
	48	4.13 ^c	4.42 ^c	2.90 ^a	3.11 ^a	0.13	0.003
	72	4.12 ^{ab}	4.23 ^{bc}	3.59 ^a	3.73 ^{ac}	0.13	0.002
Lactose yield, g/d	6	—	—	—	—	—	—
	24	14	13	5	7	1	0.020
	48	17	17	6	8	1	0.040
	72	18	21	12	10	1	0.003
Total solids, %	6	21.5 ^{bc}	20.6 ^c	17.5 ^{ab}	18.1 ^a	0.4	0.006
	24	18.6	19.0	19.1	19.1	0.6	0.988
	48	17.4	17.1	23.5	18.6	0.8	0.187
	72	18.3	17.2	16.7	17.1	0.4	0.667
Solids yield, g/d	6	—	—	—	—	—	—
	24	59	54	39	42	5	0.293
	48	73	67	37	52	6	0.194
	72	71 ^{bc}	84 ^c	62 ^{ab}	50 ^a	5	0.001
Log ₁₀ SCC	6	5.66 ^a	5.88 ^a	7.22 ^b	7.27 ^b	0.06	0.001
	24	5.46 ^a	5.91 ^a	6.24 ^a	7.32 ^b	0.17	0.005
	48	5.32 ^a	5.49 ^a	7.28 ^b	7.13 ^b	0.05	0.001
	72	5.24 ^a	5.27 ^a	6.37 ^b	6.69 ^b	0.07	0.001

^{a-c}Means within a row with different superscripts differ (*P* < 0.05).

¹Treatments by udder half were: both udder halves untreated (C00, control); half udder treated (T10 and C01, one udder half was LPS infused and the other half was untreated, respectively); and, both udder halves treated (T11, both udder halves were LPS infused).

²Time after the LPS challenge.

4.3.3.2.3 Udder skin temperature

Dramatic changes in the UST values were shown throughout the experimental period (Figure 4.6) which peaked 2 to 6 h after milking. Indoor ambient temperature, also shown in the same figure, was 23.00 ± 0.38 °C on average, ranging between 20.6 and 26.6 °C during the experiment, peaking at 36 h and slowly declining thereafter.

A circadian rhythm pattern was observed daily for UST, with minimum and maximum values before and after milking, respectively (Figure 4.6). This pattern indicated the influence of the variation in the daily temperature and management conditions. Nevertheless, no differences between treatments were observed for the mean UST values during the experiment ($P = 0.752$), with the exception of T11 which showed a peak at h 6 after the challenge ($P < 0.001$).

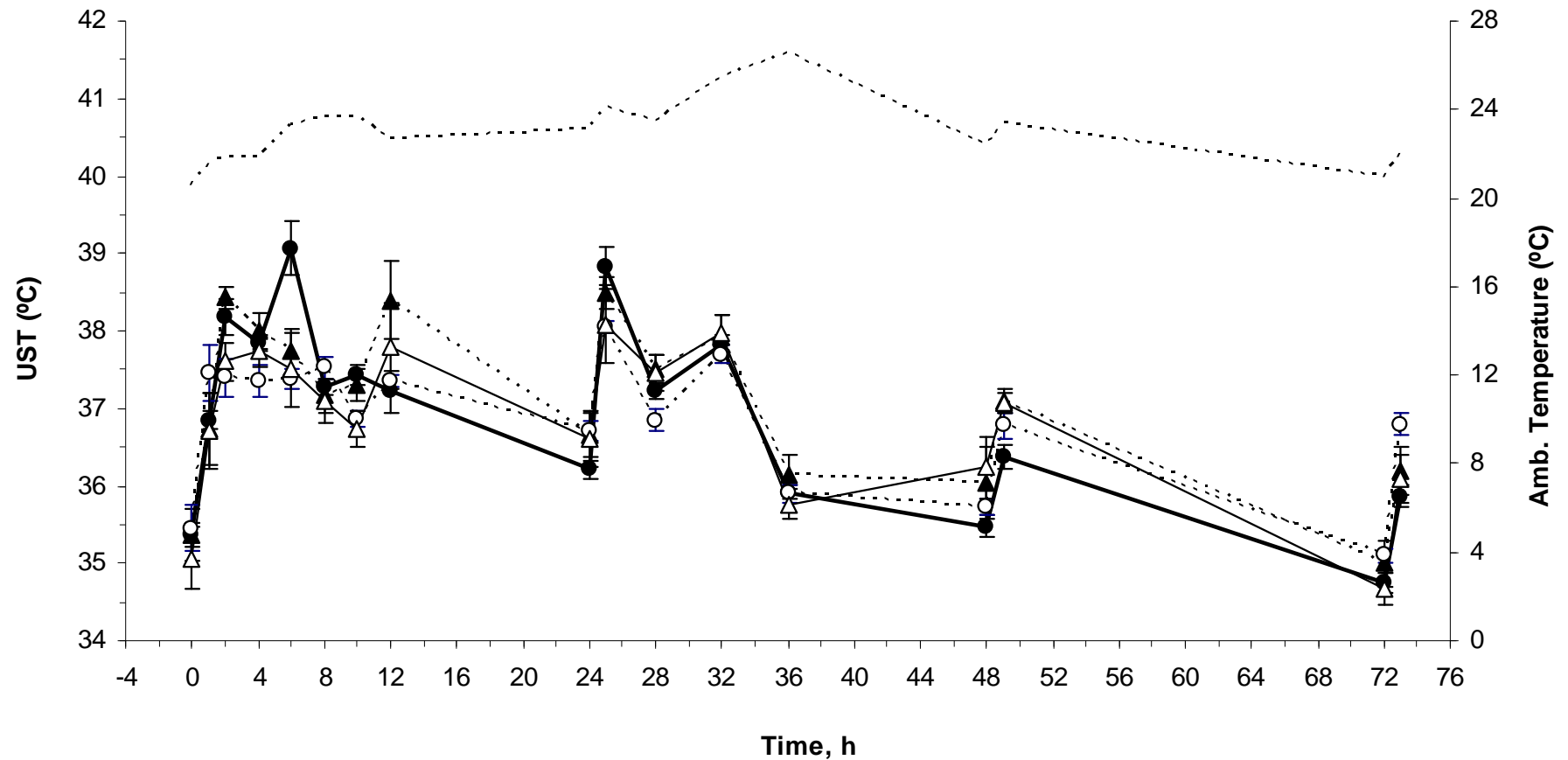
The lack of differences in the UST mean values by effect of the treatments agreed with the fact that UST values largely vary between udder halves of the same animal despite the treatment applied. Range of differences between udder halves of the same animal were high for C00 (0.05 to 0.55 °C) and T10 (0.05 to 0.85 °C) and increased in the case of T11 (0.10 to 1.00 °C), indicating a large local variation in the UST values of healthy halves and in the response to the infection in the endotoxin infused udder halves. These differences in the response to the endotoxin challenge between udder halves have not been reported previously. Our results agreed with those of Scott et al. (2000), Hovinen et al. (2008) and Pezeshki et al. (2011), which showed a similar increase of UST in the experimental and controls halves, reflecting the systemic effect of the infused endotoxin. Moreover, positive correlations between vaginal and ambient temperature (above indicated), between UST (x) and vaginal (y) temperatures ($y = 2.241 x - 49.51$; $r = 0.55$; $P < 0.001$) and between ambient (x) and UST temperatures ($y = 0.504 x + 25.72$; $r = 0.71$; $P < 0.001$) in our data also supported the lack of effects of the experimental treatments.

Barth (2000) and Polat et al. (2010) reported significant UST differences (+0.5 and +2.35 °C, respectively) in dairy cows between udder quarters with SCC below and above 100 and 400×10^3 cells/mL, respectively. Polat et al. (2010) also found a medium and positive correlation between UST and SCC ($r = 0.73$) which was lower in our ewe data ($r = 0.25$; $P = 0.032$). Additionally, Colak et al. (2008) and Polat et al. (2010) found positive correlations between UST and CMT values by udder in dairy cows ($r = 0.92$ and $r = 0.86$, respectively),

but the correlation of UST with CMT was lower and not significant in our data ($r = 0.18$; $P = 0.503$). These results did not allow us to discriminate between the UST values of endotoxin infused and healthy udder halves in our data, the variation observed being attributed to individual and environmental differences.

Our results disagree with those of Polat et al. (2010) who found 83.5% sensitivity and 100% specificity for a cut-off of 34.7 °C when udder quarters were classified as healthy or infected with subclinical mastitis ($>200 \times 10^3$ cells/mL). Previous research showed that commercial thermal cameras are capable of detecting 1.0 to 3.0°C temperature changes of udder surface in cows intramammary infused with *E. coli* endotoxin (Hovinen et al., 2008; Pezeshki et al., 2011). In our results the thermal camera was able to detect the 1 to 1.3 °C changes in UST associated with the *E. coli* endotoxin challenge in ewes.

Figure 4.6 Changes in udder skin temperature of dairy ewes submitted to an *E. coli* endotoxin lipopolysaccharide challenge at late-lactation. Treatments by udder half were: both udder halves untreated (\circ , C00, control), half udder treated (\blacktriangle , T10 and C01, one udder half was LPS infused and the other half was untreated, respectively), and both udder halves treated (\bullet , T11, both udder halves were endotoxin infused). Experimental details: *E. coli* challenge (\blacktriangle), once-daily milking (\blacktriangledown) and ambient temperature in the barn (---). Values are means with SEM indicated by vertical bars.



4.3.4 Conclusions

Thermal imaging was a simple and fast, noninvasive technique to measure the skin temperature of the mammary gland in dairy ewes at milking. Nevertheless, despite the resolution of the camera used (± 0.15 °C) and the SEM obtained for UST measures (± 0.05 to ± 0.24 °C), we were unable to discriminate between healthy, infected (subclinical or clinical) or infused with a *E. coli* lipopolysaccharide endotoxin udder halves in dairy ewes. Other factors (breed, ambient temperature, milking) can induce changes in UST greater than those observed after clinical or subclinical IMI.

CAPÍTULO 5:

USO DE SENSORES RUMINALES EN CABRAS

LECHERAS NO-LACTANTES

CAPÍTULO 5

SENSORES RUMINALES

5.1 CARACTERÍSTICAS FÍSICAS DE UN SENSOR DE PH RUMINAL

La mayoría de las reacciones biológicas y particularmente las que se dan en el rumen, se realizan en un medio acuoso. El electrodo de pH es un instrumento fundamental en el estudio de dichas reacciones. Su potencial de voltaje-pH proporciona una medida de la acidez o de la alcalinidad de las sustancias acuosas en que está inmerso. Una sustancia ácida es toda aquella capaz de ceder un ión H^+ (protón), y una base es toda sustancia capaz de aceptar un ión H^+ . Por tanto, la acidez o la alcalinidad de una solución acuosa queda determinada por la concentración de iones de hidrógeno ($[H^+]$) y aniones hidroxilo ($[OH^-]$) que están presentes. Las soluciones ácidas tienen una mayor $[H^+]$, mientras que las sustancias bases tienen una mayor $[OH^-]$.

El electrodo de pH presenta una membrana de vidrio que es permeable a los iones $[H^+]$. El electrodo está lleno de una solución neutra, que por definición contiene un número igual de iones $[H^+]$ y $[OH^-]$. Cuando la sonda está inmersa en un entorno de iones $[H^+]$, la membrana es penetrada por los iones $[H^+]$ que ejercen un potencial positivo en el electrodo. Esta diferencia de potencial es medida por el electrodo y convertida en un valor de pH. Igualmente, cuando la sonda está inmersa en un entorno $[OH^-]$, los iones de $[H^+]$ de dentro de la sonda se desplazan fuera de la misma, lo cual deriva en un exceso de iones $[OH^-]$ dentro de la sonda. El electrodo de pH detecta en este caso un potencial negativo y da valores de pH alcalinos.

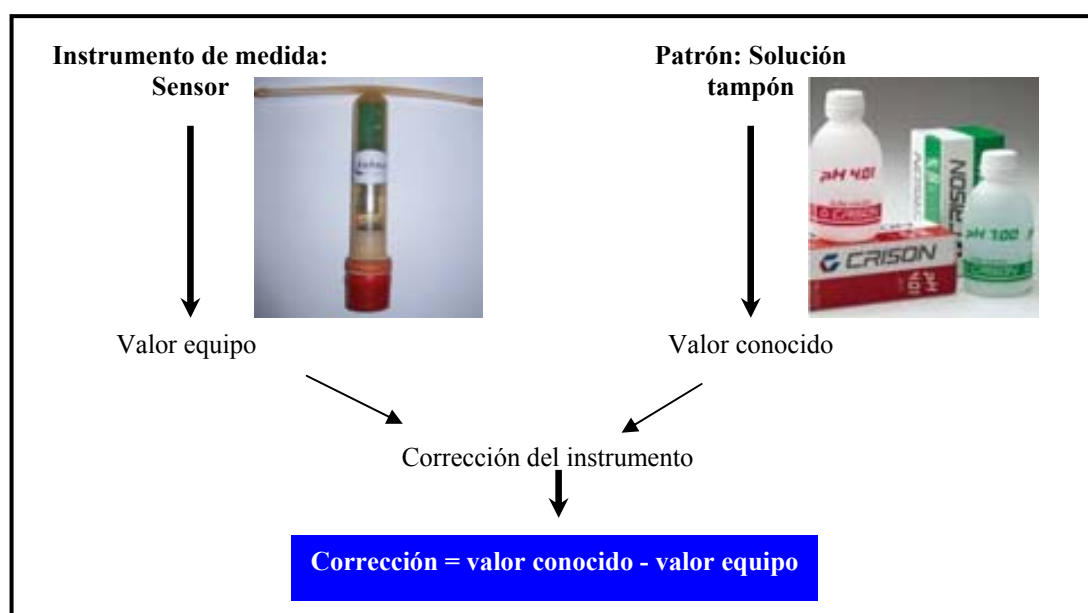
Para determinar el valor del pH con un electrodo es necesario tener un punto de referencia, pues sólo así es posible medir con precisión. Antiguamente se introducían en la solución dos electrodos de pH. Este segundo electrodo funcionaba como el punto de referencia. Actualmente el segundo electrodo de pH está integrado en el primero. Los dos electrodos están separados y trabajan de forma independiente. Mediante el intercambio de iones en la superficie de la membrana de vidrio genera una tensión eléctrica que procesada por el sistema electrónico.

La respuesta de los equipos electrónicos varía con el paso del tiempo debido a diferentes causas: envejecimiento, deterioro, limpieza, reacciones químicas,... Cuando esa variación es lenta se denomina deriva (*drift*). El *drift* se define según el Vocabulario de Metrología Internacional (VIM), como la variación lenta de una característica metrológica de un instrumento de medida (BIPM, 1993).

En medidas químicas el concepto de calibración tiene un doble significado, ya que además de la calibración instrumental existe la calibración analítica donde se relaciona la respuesta instrumental con la concentración del analito (ión) a determinar, normalmente mediante un modelo lineal.

En la Figura 5.1 se puede observar un ejemplo del proceso de calibración instrumental de un sensor. En ella se puede observar que el valor conocido proporcionado por el patrón (solución tampón de referencia), que se consigue a partir de un patrón físico o un material de referencia certificado, se expresa en la misma magnitud que mide el equipo. La relación entre el valor de magnitud conocido y el valor del equipo se suele expresar como una diferencia denominada corrección. Por lo tanto, en el proceso de calibración es fundamental el disponer de un patrón adecuado. Patrón, según el VIM (BIPM, 1993), es el valor de medición materializado, aparato o sistema de medida con el que se intenta definir, realizar, conservar, o reproducir una unidad física o bien uno o varios valores conocidos de una magnitud con el fin de que sirvan de comparación a otros elementos de medida. Al patrón de máxima calidad se lo conoce como patrón de referencia, que según el VIM (BIPM, 1993).

Figura 5.1 Calibración de un bolo ruminal electrónico para la medida de pH



Un problema común de la calibración es simplemente la prisa del operador, sin permitir que el sensor de pH responda totalmente a las soluciones adecuadas para la calibración. Para obtener una medida precisa es imprescindible calibrar el equipo de pH al inicio y al final de cada experiencia en un tiempo adecuado (estipulado por el fabricante).

La calibración consiste en medir nuevos valores para determinar el *drift* entre los valores iniciales y finales de cada sensor. Los valores de referencia de pH se obtienen mediante el uso de 2 soluciones tampón de referencia. Para obtener el valor correspondiente a cero voltios (el *offset*), el sensor debe estar en una solución *buffer* de pH 7.00; se obtiene otro punto de medida utilizando una solución de pH 4.01 y se calcula la recta de regresión obteniéndose la pendiente, siempre buscando que los puntos de calibración estén dentro del rango de medición de cada solución.

5.2 PROCEDIMIENTO DE CONFIGURACIÓN E INSERCIÓN DEL BIOSENSOR RUMINAL

5.2.1 Descripción del bolo ruminal KB1001

El sistema de telemetría utilizado para la lectura y descarga del pH (rango, 4.00 a 8.00; precisión ± 0.02) y temperatura ruminal (rango, 0 a 45 °C, precisión, ± 0.8 °C) estuvo formado por un equipo completo Khane (Auckland, Nueva Zelanda), constituido por los siguientes elementos: 1) un bolo ruminal (KB1001 ruminal bolus; 145 \times 27 mm y 70 g) equipado con sensores para medir el ambiente ruminal y enviar señales a los transmisores-receptores; 2) activador de envío de señales (KW1 Kahne Wand trigger device) mediante tiristores; 3) transmisor-receptor portátil (KR2001 top transceiver, Khane) para recibir y transmitir por radio frecuencia (433.9 MHz) las señales de datos; 3) receptor fijo (KR2002 field receiver; frecuencia, 400-500 MHz) con antena de pie (Yagi antenna, Khane) para capturar las señales de datos por medio de radiofrecuencia y enviarlas al dispositivo de almacenamiento; 4) programa de procesado de datos Kahne v.5.2.4, para habilitar la configuración y comunicación de los bolos y los transmisores-receptores a través de un ordenador.

El cuerpo del bolo está formado por un tubo de copolímero con alas flexibles (185 mm de punta a punta) en el que se sitúa un electrodo de pH en un extremo, provisto de un tapón de goma que sirve para proteger el electrodo de pH cuando no está en uso, y un sensor de

temperatura en el otro extremo. Para el propósito de estas experiencias, las alas fueran atadas para evitar daños en el rumen de las cabras (Figura 5.2).

En su interior dispone de una batería de cloruro de litio-tionilo (1.200 mAh), que puede ser encendida y apagada mediante un interruptor magnético. La duración de la batería se define por el tiempo de calibración, frecuencia de muestreo y el número de transmisiones enviadas desde el bolo. La frecuencia de muestreo puede ser ajustada entre 10 y 59 s o de 1 a 255 min. La capacidad de almacenamiento del registrador de datos del bolo es de 11.955 datos pero, una vez sobrepasado este valor, tiene capacidad para sobrescribir sobre los datos antiguos. Otra característica es la posibilidad de asociar el ID del animal con número de identificación del bolo durante el proceso de configuración.

Figure 5.2 Bolo ruminal Kahne KB1001 para la medida del pH y temperatura.

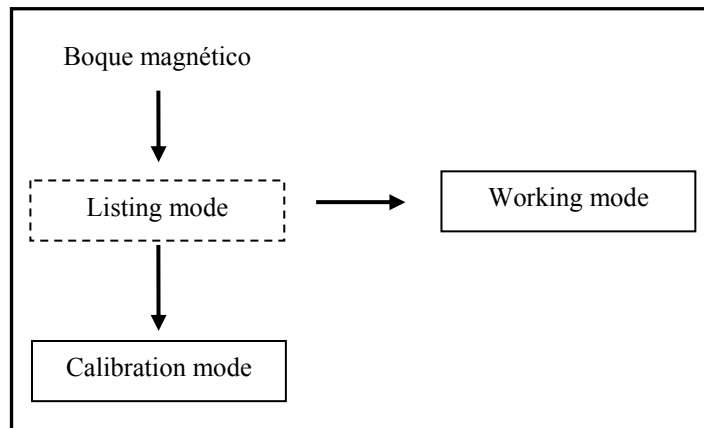


5.2.2 Configuración

Previamente a la inserción de los bolos ($n = 8$) en el saco ventral del rumen por medio de cirugía, los bolos se configuraron usando el receptor-transmisor KR2001 y el software Kahne Data Processing System v.5.1. Los bolos tienen capacidad de trabajar en tres modos de funcionamiento (Figura 5.3): 1) Escucha (*listening*), activado al aproximar un bloque magnético que enciende la batería y espera las instrucciones de configuración, e indicado por medio de una luz (led) permanentemente encendida en el bolo; 2) Calibración, indicado por medio de una luz intermitente en el bolo a cada 5 segundos. Este modo se selecciona cuando

el sensor de pH está siendo calibrado (ver sección 5.2.3), y al término de la calibración, el bolo vuelve al modo *listening* a la espera de más instrucciones; 3) Trabajo (*working*) indicado mediante dos luces intermitentes que indican que el bolo está configurado, calibrado y listo para operar.

Figure 5.3 Etapas de configuración de los biosensores



5.2.3 Calibración

El proceso de calibración se realizó inmediatamente antes de las experiencias, a fin de garantizar la exactitud de los datos. La calibración del pH siguió el proceso descrito en Kahne (2010).

Para calibrar los bolos se utilizaron soluciones de referencia de pH certificadas (pH 7.00 y pH 4.01), como se ha indicado en la sección 5.1. Los materiales utilizados fueron un baño de agua con termostato, bomba de circulación y cisterna de agitación; tres termómetros de referencia de 300 mm (Modelo varilla relleno de líquido coloreado, Nahita Tecnologia, Beriáin, Navarra, España) con un rango de medida de -10 a $+150$ °C y precisión ± 0.1 °C; vasos de precipitados de 100 ml; agua desionizada; soluciones tampón (pH 7.00 y 4.01 y precisión ± 0.02 unidades (Crison Instruments SA, Barcelona, Spain); y ordenador con el software Kahne (Data Processing System v.5.1), conectado con el receptor-transmisor KR2001.

Previamente a su activación, los bolos se sumergieron en un baño de agua desionizada a 40 ± 0.5 °C durante 20 min para estabilizar su temperatura. Paralelamente, se conectó el KR2001 al ordenador mediante un cable USB, a fin de visualizar los valores de configuración

y calibración, y transferir la información de cada bolo al ordenador. Los bolos se activaron en modo *listing* mediante el bloque magnético y el software dispuso la ventana *bolus configuration dialog* para cargar los datos de configuración (identificación del bolo, animal, fecha, hora, frecuencia de toma de datos). A continuación, cada bolo activado se mantuvo sumergido en un baño de agua a 40 ± 0.5 °C por aproximadamente 2 min a fin de estabilizar de nuevo su temperatura, manteniendo el electrodo de pH sumergido en una solución tampón de pH 7.00 en un vaso de precipitados de 50 ml. Posteriormente, se seleccionó el modo *calibration* en el software y el bolo comenzó a leer y grabar en la ventana del software (*real time table view*) los valores del pH 7.00 cada 4 s. Cada calibración fue realizada durante 5.0 ± 0.8 min. Todos los bolos fueron sacados del pH 7.00, enjuagados con agua desionizada y secados. Se siguió el mismo procedimiento para realizar la calibración en solución tampón pH 4.01. Las medidas de calibración se repitieron al final del experimento (misma orden), después de la recuperación de bolos, para calcular la deriva entre los valores de entrada y de salida de cada bolo.

5.2.4 Transmisión

El sistema operativo utiliza la función RFID (identificación por radio frecuencia) que permite la transmisión de datos *on-line* desde el bolo hasta el ordenador usando el transmisor KW1 y el receptor KB2002.

El dispositivo KW1 se situó en el lado izquierdo del animal a una distancia <10 cm del rumen. Una vez activado, el bolo transmitió los datos registrados al receptor KB2002, situado en posición vertical y a aproximadamente 1 m del rumen. En cada descarga ejecutada los datos se borran y el bolo restablece automáticamente la función de toma de datos de pH y temperatura, con la misma configuración definida antes de su inserción en el rumen. Otra posible alternativa, es almacenar en el registrador interno de datos del bolo de forma continua (11.955 datos) y descargarlos al final del experimento (una vez sacados del rumen), observando para no exceder el límite máximo de datos.

En las experiencias realizadas, se registraron datos cada 30 min y su transmisión se llevó a cabo dos veces, al final de cada período de medida de cada experiencia. Esta frecuencia de muestreo fue seleccionada para reducir el tamaño de la memoria necesaria para el almacenamiento de datos y aumentar la duración de la batería.

5.2.5 Cirugía Ruminal

Dado el tamaño de los bolos, se introdujeron en el rumen mediante cirugía. El procedimiento de cirugía se inició con la aplicación de tranquilizantes (0.3 mL de xilacina y 1 mL de ketamina) por vía intra-muscular. A continuación, se realizó el lavado y afeitado de la zona abdominal izquierda (15 × 20 cm) y su desinfección con clorhexidina.

Se aplicó anestesia local por vía subcutánea (4 mL de lidocaína) en una línea dorsoventral de 15 cm, situada entre la última costilla y la tuberosidad ilíaca, donde se realizó una incisión en la piel, capa subcutánea y capa muscular de aproximadamente 10 cm. Después de sujetar el rumen, se realizó una ruminotomía de 8 cm. A continuación se activó el bolo (modo *working*) y se introdujo en el rumen con las alas plegadas.

El rumen se suturó en dos capas (sutura inicial de patrón continuo y posterior sutura de Lembert), con sutura Monosyn N° 0 y con aguja HR26 (calibre cilíndrico). La capa muscular se cerró con sutura Reverdin y MonoPlus N° 2 y aguja HS40 (calibre triangular). La capa de piel se cerró con sutura Monosyn N° 2 y aguja HS40 (calibre triangular), haciendo un patrón horizontal en forma de U.

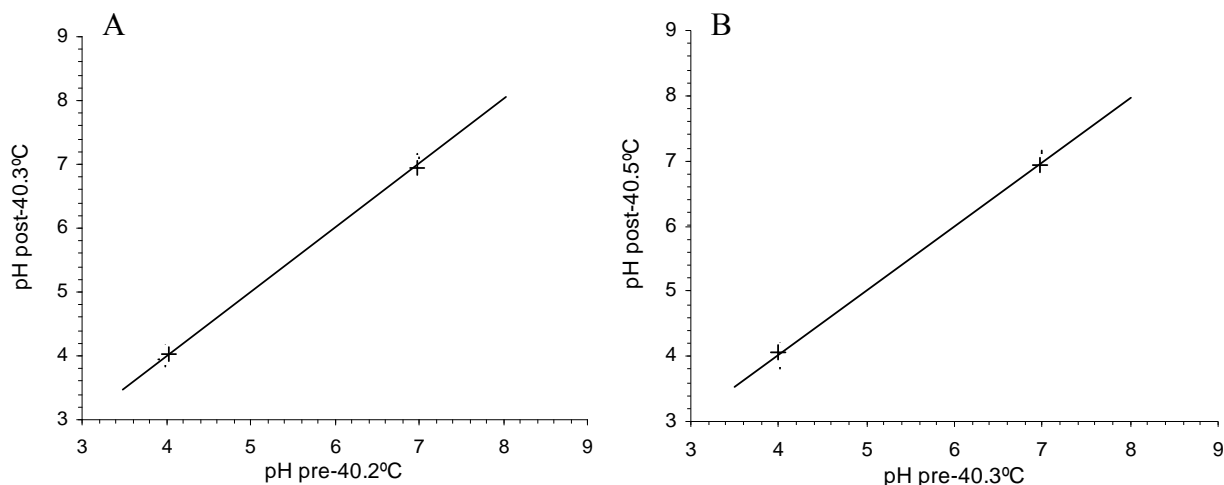
Al final de la cirugía, la herida fue lavada con agua oxigenada y se aplicó un protector de aluminio a fin de estimular el proceso de curación. Por último, se aplicó anti-inflamatorio (Metacam, 20 mg/ml) y antibiótico (Invemox, 1.5 mg/ml) durante 5 d consecutivos por vía intra-muscular.

5.2.6 Validación de la Tecnología Usada

Los valores de calibración de los 8 sensores en ambos experimentos se muestran en las Figuras 5.4 (a y b). La deriva media de los sensores de pH para los tampones 7.00 y 4.01, fue de -0.03 y +0.01 (precisión, ± 0.02) en la Exp. 1, y de +0.00 y +0.01 (precisión, ± 0.02) en la Exp. 2, respectivamente.

Por lo tanto, los resultados obtenidos confirman que los biosensores midieron con precisión durante ambos experimentos. Pese a no comparar los valores del pH ruminal de los sensores con los valores adquiridos por medio de métodos pH tradicionales, otros trabajos anteriores observaron una relación entre los dos métodos, tanto en el caso de vacas ($r = 0.59$; Lohölter et al., 2013) como de ovejas ($r = 0.46$; Kaur et al., 2010), alimentadas con raciones con diferentes relaciones forraje:concentrado.

Figura 5.4 Deriva del pH de los bolos en las calibraciones pre y post-experimento realizadas a 40.0 ± 0.5 °C: a) Exp. 1 ($y = 1.0085 x - 0.0482$; $r = 0.99$, $P < 0.001$); b) Exp. 2 ($y = 0.9914 x + 0.0463$; $r = 0.99$, $P < 0.001$).



5.4 USING WIRELESS TELEMETRIC SENSORS FOR EVALUATING THE EFFECTS OF DIET AND AMBIENT TEMPERATURE IN NON-LACTATING DAIRY GOATS. (*Uso de sensores de telemetría inalámbrica para evaluar los efectos de la ración y la temperatura ambiente en cabras no-lactantes*)

Resumen

Se utilizaron un total de 16 cabras lecheras Murciano-Granadina múltiparas no-lactantes, provistas de sensores ruminales de telemetría inalámbrica de pH y temperatura (KB1001, Kahne bolo), en 2 experimentos para evaluar las variaciones ruminales producidas por raciones con diferente relación forraje:concentrar (Exp. 1) y por diferentes condiciones climáticas (Exp. 2). Las cabras fueron sometidas a cirugía para insertar los bolos ruminales programados para registrar y almacenar el pH y la temperatura del rumen cada 30 min. En el Exp. 1, 8 cabras (38.6 ± 2.3 kg PV) se asignaron a 2 grupos que se alimentaron a nivel de mantenimiento con 2 raciones isoproteicas con distinta relación forraje: concentrado (HF, alto forraje 70:30 y LF, bajo forraje 30:70), según un diseño cruzado, que consistió en 2 periodos de 19 d y 4 cabras cada uno. La ración (seca) y el agua (9.8 °C) se ofrecieron una vez al día y durante tiempo limitado (comida, 1130 a 1530 h; agua, 1745 a 1815 h). La

temperatura rectal se midió 3 veces al día (0900, 1300 y 1700 h). El pH ruminal fue mayor ($+0.31 \pm 0.06$; $P < 0.001$) en las cabras HF respecto a las LF. No se detectaron diferencias en las temperaturas rectal y ruminal entre tratamientos (38.2 ± 0.1 y 38.9 ± 0.1 °C, como media, respectivamente), estando ambas temperaturas relacionadas ($r = 0.91$, $P < 0.001$). La temperatura ruminal cayó 3.5 °C después de la toma de agua, siendo necesarias 2 h para que la temperatura se recuperara a valores medios. En el Exp. 2, 8 cabras (43.9 ± 1.0 kg PV) provistas de los mismos sensores ruminales, alojadas en jaulas metabólicas y alimentadas a nivel de mantenimiento con una ración 50:50 forraje:concentrado, se sometieron a 2 condiciones ambientales según un diseño experimental cruzado con 2 periodos de 21 d y 4 cabras cada uno. Las condiciones ambientales fueron: 1) termo neutra (TN, 20 a 23°C durante día y noche) y 2) estrés por calor (HS, 12 h día a 37°C y 12 h noche a 30°C). La humedad relativa ($40 \pm 5\%$) y el fotoperiodo (12-12 h) se mantuvieron constantes. La ración se ofreció una vez al día y se registró el consumo de MS diariamente. El agua se ofreció libremente a temperatura ambiente. La temperatura rectal y la frecuencia respiratoria se registraron diariamente (0900, 1300 y 1700 h). Aunque no se observaron diferencias en la ingestión de MS, el pH ruminal de las cabras HS fue menor que el de las TN (-0.12 ; $P < 0.01$). Por el contrario, la temperatura ruminal ($+0.30$ °C) y rectal ($+0.4$ °C), frecuencia respiratoria ($+77$ respiraciones/min), y el consumo de agua ($+3.2$ L /d) fueron mayores ($P < 0.01$) en las cabras HS respecto a las TN. En conclusión, los bolos inalámbricos mostraron ser una herramienta útil para detectar los cambios en el pH y temperatura ruminal según cambios en la alimentación y condiciones climáticas. A pesar del similar consumo de MS, el pH ruminal fue menor bajo temperaturas ambientales altas, lo que podría indicar una alteración en la fermentación microbiana en condiciones de estrés térmico.

Abstract

Sixteen multiparous non-lactating Murciano-Granadina dairy goats, provided with wireless telemetric rumen sensors of pH and temperature (KB1001 Kahne bolus), were used in 2 consecutive experiments to assess ruminal variations produced by rations with different forage:concentrate ratio (Exp. 1) and to monitor the effects of heat stress (HS) on the rumen environment (Exp. 2). Goats were subjected to ruminal surgery to insert the rumen boluses programmed to record and store rumen pH and temperature every 30 min. In Exp. 1, 8 goats

(38.6 ± 2.3 kg BW) were divided into 2 groups and fed 2 isonitrogenous rations varying in the forage to concentrate ratio (HF, high forage 70:30; LF, low forage 30:70) according to a crossover design, consisting of 2 periods of 19 d and 4 goats each. Diets and water were offered once-daily at 1130 (for 4 h) and 1745 (for 30 min), respectively. Rectal temperatures were recorded 3 times daily (0900, 1300 and 1700). Rumenal pH was greater (+0.31 ± 0.06; $P < 0.001$) in the HF than LF. No rectal and ruminal temperature differences were detected between treatments (38.2 ± 0.1 and 38.9 ± 0.1 °C on average, respectively), the ruminal and rectal temperatures being correlated ($r = 0.91$; $P < 0.001$). Rumen temperature decreased by 3.5 °C after drinking, and 2 h were needed to return to the average values. In Exp. 2, 8 goats (43.9 ± 1.0 kg BW) were kept in metabolic cages, fed a 50:50 forage to concentrate diet, and exposed to 2 ambient temperatures. Experimental design was a crossover with 2 periods of 21 d and 4 goats each. Climatic conditions were: 1) thermal neutral (TN, 20 to 23 °C day-night), and 2) heat stress (HS, 12-h day at 37 °C and 12-h night at 30 °C). Humidity was 40 ± 5% and light-dark cycles were 12-12 h. Feed was offered once daily and feed intake was recorded daily. Water was freely available at ambient temperature. Rectal temperature and respiratory rate were daily recorded (0900, 1300 and 1700 h). Although both goat groups had similar DMI, rumen pH was 0.12 units lower ($P < 0.01$) in HS than in TN. On the contrary, rumen temperature (+0.30 °C), rectal temperature (+0.4 °C), respiratory rate (+77 breathes/min), and water consumption (+3.2 L/d) were greater in HS than TN ($P < 0.01$). In conclusion, wireless boluses proved to be a useful tool for monitoring rumen pH and temperature as affected by different management and climatic conditions. Despite the same feed intake, rumen pH was lower by high ambient temperature, which might indicate an altered microbial fermentation under heat stress conditions.

5.4.1 Introduction

Continuous readings by telemetry help in measuring responses dynamically and defining associations with different management and environmental variables (Eigenberg et al., 2008; Rutten et al., 2013). By the use of wireless telemetric rumen boluses for temperature measurement, significant effects of estrus and parturition (Cooper-Prado et al., 2011), bovine viral diarrhea infection (Rose-Dye et al., 2010), SARA (Alzahal et al., 2009), and

intramammary injection of LPS (Alzahal et al., 2011) on rumen temperature have been reported.

Changes in ambient temperature provoke different responses in the nervous, circulatory, respiratory, renal and endocrine systems, which allow the animal to cope with the altered environment. Different physiological, lactational, and nutritional responses to heat stress (**HS**) have been reported in dairy cows (Baumgard and Rhoads, 2013) and goats (Hamzaoui et al., 2013; Salama et al., 2013). However, little is known about ruminal changes in pH and temperature due to HS in dairy animals.

When feed intake was held constant in hot and thermo-neutral environments, HS reduced the concentration of VFA in the rumen of cattle (Kelly et al., 1967), increased the concentration of lactic acid, and reduced ruminal pH (Mishra et al., 1970). Moreover, profiling the bacterial species composition of rumen fluid using 16sRNA gene cloning revealed that HS resulted in consistent changes in microbial diversity, reduced VFA concentrations and an overall lowering of rumen pH in heifers (Tajima et al., 2007). To our knowledge, rumen biosensors have not been used in goats to continuously measure changes in ruminal environment under HS conditions.

The objective of the current study was to evaluate the use of ruminal biosensors to assess ruminal variations produced by rations with different forage:concentrate ratios and to monitor the effects of HS on the rumen environment of non-lactating goats. To avoid the confusion between reduced DMI and HS effects, both thermo-neutral and HS non-lactating goats were kept at the same level of feed intake to meet maintenance requirements.

5.4.2 Materials and Methods

The treatment procedures and animal care conditions were reviewed and approved by the Ethical Committee on Animal and Human Experimentation of the Universitat Autònoma de Barcelona (reference CEEAH 11/1166) and the codes of recommendations for the welfare of livestock of the Ministry of Agriculture, Food and Environment of Spain.

Description, Calibration, and Insertion of the Wireless Ruminal boluses

A wireless system based on radiofrequency boluses designed for large animals (>300 kg BW) was used for rumen pH and temperature recording in goats. The recording system

included (Kahne, Auckland, New Zealand): 1) rumen boluses (KB1001; 27 mm o.d., 145 mm length, and 70 g weight), 2) portable trigger for activating the boluses (KW1 Kahne Wand), 3) portable receiver for capturing the data signals sent by the boluses (KR2001; frequency, 433.9 MHz), 4) stationary receiver with a large antenna (KR2002; frequency, 400 to 500 MHz) for transmitting the data to the storage device through radiofrequency, and 4) software for enabling the configuration and communication between boluses and the transceiver via a computer (Kahne Data Processing System V.5.2.4). A magnet block was used to turn on and off the boluses. Measurement ranges of the rumen boluses were 0 to 45 °C (accuracy ± 0.8 °C) and 4.00 to 8.00 pH units (accuracy ± 0.02).

A calibration process was done before each experiment according to the manufacturer instructions using deionized water (40 ± 0.5 °C) for temperature and 4.01 and 7.00 pH buffer solutions (Crison Instruments, Barcelona, Spain). Before the insertion into the rumen, boluses were configured to record rumen pH and temperature values every 30 min throughout the experiment. Data downloads were done at the start and end of each measurement period in each experiment.

Boluses were inserted into the rumen through surgery (Dehghani and Ghadrani, 1995). Goats were sedated by i.m. injection of 0.3 mL xylazine (Rompun 50 mg/mL; Bayer Hispania, Barcelona, Spain) and 1 mL ketamine (Ketamina 50 mg/mL; Merial, Lyon, France). After washing, clipping and disinfecting, a vertical incision of approximately 10 cm was done in the left flank, between the last rib and the iliac tuberosity. After pulling out the rumen wall to the incision with the help towel clamps, a ruminotomy of 8 cm was done and the bolus was introduced into the rumen with the wings folded and tied to prevent damages to the rumen wall. After the rumen wall, muscle layer and skin were sutured, 2 mL of meloxicam anti-inflammatory (Metacam 20 mg/mL; Boehringer-Ingelheim, Barcelona, Spain) and 4 mL of amoxicillin (Invemox 150 mg/mL; Invesa, Barcelona, Spain) were i.m. injected for 5 d.

5.4.2.1 Experiment 1

5.4.2.1.1 Animals, management conditions, and treatments

Eight multiparous non-lactating Murciano-Granadina goats (38.6 ± 2.3 kg BW) were used from the flock of the Experimental Farm of the Servei de Granges i Camps Experiments (SGCE) of the Universitat Autònoma de Barcelona (Bellaterra, Barcelona, Spain). Goats were

kept in straw bedded pens and each animal individually received food and water. Minimum and maximum environmental temperatures averaged 10.0 ± 0.4 and 16.2 ± 0.5 °C, respectively, in the experimental barn throughout the experiment.

Goats were allowed 17-d recovery period after boluses insertion by surgery. The experimental design was a crossover with 2 treatments in 2 periods, lasting 19 d, and 4 goats each. Goats were switched to the opposite treatment in the second period with a 3 d of gradual shift to the new diet. The treatments were 2 diets with different forage:concentrate ratio (**HF**, high forage 70:30; **LF**, low forage 30:70). Dehydrated fescue hay and barley were used to formulate diets that cover the maintenance requirements according to INRA (2007). The diet was daily offered at 1130 and withdrew at 1530 h, whereas water was offered at 1745 h for 30 min. Goats had free access to mineral-vitamin blocks.

5.4.2.1.2 Sampling, measurements, and analyses

Data were collected during the last 7 d of each period. Samples of feed ingredients were taken at the start of the experiment and, diets and orts were daily sampled, composited and stored at 4 °C until analysis. Feed intake and water consumption were daily recorded. The samples were ground through a 1 mm stainless steel screen for the determination of DM, NDF and ADF according to AOAC (2003). The DM was determined at 103 °C for 24 h and then samples were burnt in a muffle furnace at 550 °C for 4 h to measure ash content. The CP was analyzed according to the Dumas method for N determination using a Leco analyzer (Leco Corporation, St. Joseph, MI). The NDF and ADF were determined using an Ankom200 Fiber Analyzer incubator (Ankom Technology, Macedon, NY) adding amylase and sodium sulphite solutions. Chemical composition and nutritive value of the ration ingredients are shown in Table 5.1.

Daily rectal temperatures were measured at 0900, 1300, and 1700 h by a digital clinical thermometer (Model mini color, ICO Technology, Barcelona, Spain; range, 32.0 to 43.9 °C; accuracy, ± 0.1 °C). Urine was individually collected at the last day of each period before feeding and pH was measured using a portable pH-meter (pH25, Crison Instruments, Barcelona, Spain) within 1 h after collection.

Table 5.1 Chemical composition and nutritive value (DM basis) of the ration ingredients used for non-lactating goats.

Item	Exp. 1		Exp. 2	
	Fescue hay	Barley	Alfalfa hay	Barley
Component, %				
DM	91.7	91.0	88.6	89.5
OM	88.3	97.1	87.4	97.4
CP	10.7	9.6	20.0	10.8
NDF	55.4	17.7	36.7	16.4
ADF	32.5	5.9	27.0	6.1
Nutritive value ¹				
UEm/kg ²	1.30	–	0.90	–
UFL/kg ³	0.72	1.05	0.72	1.06
NE _L , Mcal/kg	1.22	1.79	1.22	1.80
PDIE ⁴ , g/kg	77	95	101	98
PDIN ⁵ , g/kg	67	66	128	74
PDIA ⁶ , g/kg	28	28	56	32
Ca, g/kg	4.5	0.8	16.7	0.8
P, g/kg	3.0	4.0	2.3	4.0

¹Calculated according to INRA (2007).

²Fill units for sheep (1 UEm = 1 kg DM reference grass).

³Feed units for maintenance (1 UFL = 1.7 Mcal EN_L).

⁴Protein digested in the small intestine supplied by microbial protein from rumen-fermented organic matter.

⁵Protein digested in the small Intestine supplied by microbial protein from rumen-degraded protein.

⁶Protein digested in the small Intestine supplied by rumen-undegraded dietary protein.

5.4.2.2 Experiment 2

5.4.2.2.1 Animals, management conditions, and treatments

Eight Murciano-Granadina non-lactating goats (43.9 ± 1.0 kg BW) from the Experimental Farm of the SGCE were used. The experimental design was a crossover with 2 treatments in 2 periods, lasting 21 d, and 4 goats each. Goats were switched to the opposite treatment in the second period. Treatment conditions were: 1) thermal neutral (**TN**; 20 to 23°C and 45%; THI = 65 to 68), and 2) heat stress (**HS**; from 0900 to 2100 h at 37 °C and 40%; THI = 85; and from 2100 to 0900 h at 30 °C and 40%; THI = 77). The THI values were calculated according to NRC (1971) as follows: $THI = (1.8 \times Tdb + 32) - [(0.55 - 0.0055 \times RH) \times (1.8 \times Tdb - 26.8)]$, where Tdb is the dry bulb temperature (°C) and RH relative humidity (%).

Throughout the experiment, the TN goats were kept indoors and the temperature was maintained at 20 to 23 °C with the help of air conditioning system (Summit-Serie E10; Hitachi, Barcelona, Spain). The HS goats were kept in a 4 × 6 × 2.3 m isolated chamber (Euroshield, ETS Lindgren-Euroshield Oy, Eura, Finland) provided with a temperature and humidity controlling system (Carel Controls Ibérica, Barcelona, Spain). A continuous 90 m³/h air turnover was maintained in the chamber throughout the experiment.

Goats had a 14 d pre-experimental period for the recovery from the ruminal surgery and for the adaptation to diet and metabolic cages. When goats were switched from TN to HS conditions, a transition period of 2 d was allowed (1 d at 25°C and 1 d at 30°C), but no transition was applied for the change from HS to TN. Photoperiod was maintained constant at 12-12 h light-dark (0900 to 2100 h).

Goats fed a ration with 50:50 forage:concentrate ratio at maintenance level according to INRA (2007). The ration consisted of (as fed) dehydrated alfalfa hay (1.22 Mcal of NEL/kg and 20.0% CP; DM basis) and concentrate (1.80 Mcal NEL /kg, 10.8% CP, DM basis). The amount of feed was individually calculated in accordance with each goat BW. Mineralized salt blocks were freely available in each metabolic cage (Composition: Na, 36.74%; Ca, 0.32; Mg, 1.09%; Zn, 5 g/kg; Mn, 1.5 g/kg; S, 912 mg/kg; Fe, 304 mg/kg; I, 75 mg/kg; Co, 50 mg/kg; Se, 25 mg/kg; Ovi bloc, Sal Cupido, Terrasa, Spain). Clean water was freely available at ambient temperature for each treatment.

5.4.2.2 Measurements, sampling and analyses

Rectal temperatures and respiration rates were daily recoded at 0900, 1300 and 1700 h. The rectal temperature was measured with the same digital clinical thermometer used in Exp. 1. The respiration rate was measured by counting the inhalations and exhalations for 60 s with the aid of a chronometer.

Feed was offered once a day at 1200 h and water consumption (accuracy, ± 20 g) were recorded daily throughout the experimental period. Trays with saw dust were put below the drinking troughs and weighted twice daily to take into account water wastes. Feed samples were collected before the beginning of each experimental period and were analyzed as for Exp. 1. Feed orts were daily collected, weighed, and composited for analysis. Feces of each goat were daily collected and 10% of fresh feces were dried at 60 °C for 48 h. Then a composited sample for each goat was stored at room temperature until analysis. Orts, feces, and fecal samples were ground through a 1 mm stainless steel screen and then analyzed for DM, CP, ADF, NDF (AOAC, 2003).

Blood samples (approximately 0.3 mL) were collected before feeding only at the end of the second period by using insulin syringes (1 mL BD Micro-Fine, BD Medical-Diabetes Care, Franklin Lakes, NJ). A single drop of blood was applied to disposable cartridges containing biochemical and silicon chip technology (i-STAT EC8+, Abbott Point of Care, Princeton, NJ). Then, the cartridge was inserted into an i-STAT handheld analyzer, and the results of glucose, urea, Cl, Na, K, total CO₂ concentration, anion gap, hematocrit, hemoglobin, pH, partial pressure of CO₂, HCO₃⁻, and base excess were obtained.

5.4.2.3 Statistical Analyses

Data were analyzed by the PROC MIXED for repeated measurements of SAS version 9.1.3 (SAS Inst. Inc., Cary, North Carolina, USA). The statistical mixed model used for both experiments contained the fixed effect of treatment by experiment (Exp. 1, HF vs. LF; Exp. 2, TN vs. HS), period (1 and 2 for each experiment) and measuring day (1 to 7), and the random effects of the animal (Exp. 1, 1 to 8; Exp. 2, 9 to 16), the interactions treatment \times day and treatment \times period, and the residual error.

Data of rumen temperature and rumen pH were averaged for the 7-d measurement period and the fixed effect of the day- hour was included in the model rather than the day effect. Data

of digestibility and blood measures (Exp. 2) were analyzed by ANOVA using PROC GLM of SAS. The model contained the effects of treatment and period, the interaction treatment \times period, and the residual error. Models took into account the possible carryover effects of previous treatment period through the interaction between treatment and period. Moreover, data of Exp. 1 were used for the construction of sigmoidal curves to summarize daily ruminal pH records using calculated time below (min/d) as the y-variate and pH cutoff point as the x-variate.

Differences between least squares means were determined with the PDIFF option of SAS. Pearson's correlations were used to determine the relationship between the studied variables. Significance was declared as $P < 0.05$, unless otherwise indicated, and tendencies were discussed at $P < 0.10$.

5.4.3 Results and Discussion

At the end of each experiment, boluses were surgically recovered and they were found in the ventral sac. After boluses recovering, drifts from the initial values were calculated using pH standard solutions 4.01 and 7.00. The overall drifts for both experiments were small and averaged and 0.01 ± 0.02 and -0.02 ± 0.02 for pH 4.01 and 7.00, respectively. These results indicate that sensors were measuring accurately throughout experiments, which agrees with the findings of Mullins et al. (2012) and Hassanat et al. (2013). We did not compare between rumen pH measured by sensors and traditional pH meters, but in previous research works, a significant relationship was detected between measures by the 2 methods in cows ($r = 0.59$; Lohölter et al., 2013) and sheep ($r = 0.46$; Kaur et al. (2010) fed rations with different forage:concentrate ratios.

5.4.3.1 Experiment 1

5.4.3.1.1 Feed intake and water consumption

In the current study, HF and LF goats were at the same ambient conditions and fed at maintenance level, and no differences were detected in DMI or water consumption (Table 5.2). Predicted water intake (W, L/d) according to the Giger-Reverdin et al. (2011) equation for dairy goats under temperate ambient conditions ($W = 0.0892 \text{ BW} + 0.673 \text{ MY}$), being

body weight (BW, kg) and milk yield MY (L/d), was 3.44 L/d in our goats (38.6 kg BW and 0 milk), as shown in Table 5.2, which was 15% greater than the actual water consumption recorded which averaged 3.90 L/d (plus 0.07 L from feed).

5.4.3.1.2 Ruminal pH and temperatures

On average, ruminal pH value for HF diet was 0.31 units greater than for the LF diet in our goats (Table 5.2). Similarly, Cantalapiedra-Hijar et al. (2009) reported similar ruminal pH values measured by pH meter in Granadina goats provided of rumen cannulas when fed diets with 70:30 (pH 6.43) or 30:70 (pH 6.26) forage:concentrate diets due to a greater production of VFA and a higher concentration of lactic acid in the rumen when the proportion of concentrate in the diet increased.

We are not aware of previous studies measuring rumen pH over 24 h with short time intervals (i.e., every 30 min) as in our goats. Rumen pH in LF goats was lower ($P < 0.01$) than in HF goats at all time points except from 9 to 14 h after feeding (Figure 5.6). The pattern of the pH curve varied according to the diet. For the HF diet, there was a linear slow descending phase until 12.5 h post feeding (pH decreased by 0.37 units; $y = 6.58 - 0.02 x$; $r^2 = 0.86$; $P < 0.01$) followed by a linear ascending phase until 24 h ($y = 5.83 + 0.04 x$, $r^2 = 0.99$; $P < 0.001$). On the other hand, in LF goats, pH rapidly decreased by 0.50 units during the first 6 h after feeding ($y = 6.36 - 0.05 x$, $r^2 = 0.79$; $P < 0.01$), linearly increased from 6.5 to 9 h ($y = 5.63 + 0.07 x$; $r^2 = 0.96$; $P < 0.001$), steadied from 9.5 to 18 h, and finally increased until 24 h ($y = 5.19 + 0.06 x$; $r^2 = 0.98$; $P < 0.001$). Mishra et al. (1970) reported that a high roughage diet induces a delayed microbial fermentation compared to a concentrate diet, which agrees with the slower reduction in rumen pH observed in our HF compared to LF diet. The increase in rumen pH 12 h (HF goats) and 18 h (LF goats) post-feeding could be a result of the buffering properties of the saliva entering the rumen during rumination.

It is also possible to study the dynamics of rumen pH by measuring the amount of time spent below pH cut-off points, thus adding more accuracy to the interpretation of ruminal pH data. AlZahal et al. (2007) proposed such ruminal pH models using logistic curves. A sigmoidal shaped curve was generated by plotting the accumulated time spent below (y-variable, 0 to 1440 min/d) each pH point (x-variable, pH 5.9 to 7.0) for both diets (Figure 5.7). The inflection points on pH curves were 6.51 at 735 min and 6.26 at 773 min for HF and

LF diets, respectively. These inflection values were very close to actual pH averages reported in Table 5.2. Despite differences between diets and rumen pH, the slope of curves was similar.

Table 5.2 Daily nutrient intakes, ruminal pH and temperatures, body temperature a urine pH in non-lactating dairy goats fed diets with 70:30 (HF; n = 8) or 30:70 (LF; n = 8) forage to concentrate diets (Values are least squares means and SE of the difference).

Item	Diet			Effect (<i>P</i> =)		
	HF	LF	SED	Treatment	Period	T × P ¹
Daily intake						
DM, g	871	786	77	0.323	0.783	0.378
CP, g	104	90	9	0.170	0.897	0.385
NDF, g	446	263	38	0.005	0.983	0.456
ADF, g	246	126	21	0.003	0.952	0.488
NE _L , Mcal						
Water, L	3.72	4.07	0.96	0.728	0.228	0.878
Rectal temperature, °C	38.22	38.16	0.13	0.660	0.161	0.464
Rumen temperature						
Average, °C	38.82	38.92	0.12	0.396	0.156	0.783
≥ 38.8, min/d ²	908	938	126	0.851	0.659	0.606
≥ 39.2, min/d ²	548	540	150	0.968	0.680	0.266
≥ 39.6, min/d ²	305	120	162	0.458	0.607	0.980
Rumen pH	6.56	6.25	0.06	0.001	0.048	0.001
Urine pH	7.65	7.67	0.20	0.923	0.063	0.552

¹Interaction Treatment × Period

Rumen temperature values averaged 38.9 ± 0.1 °C and no differences were detected between HF and LF diets throughout the experiment (Table 5.2). These results are contrary to those of AlZahal et al. (2009; 2011), Wahrmund et al. (2012), and Lohölter et al. (2013) who reported greater rumen temperature with high concentrate diets in cattle, and may be

consequence of the maintenance feeding level used in our goats. Heat is considered a byproduct of microbial fermentation (Hungate, 1966) and, therefore, concentrates are expected to generate more heat within the rumen during a given period of time post-feeding than forage diets. In the current study, no goat had rumen pH below 5.6 (SARA limit in cattle) at any time point, indicating normal conditions in the rumen. Only 4 LF goats had pH values slightly lower than 6.00 ($\text{pH} = 5.94 \pm 0.03$ for 105 ± 45 min).

On the other hand, the previous studies, in which rumen temperature was affected by diet, indicated lower rumen pH values than 5.6 (AlZahal et al., 2009; 2011). The differences in rumen temperature between treatments could be also tested as the durations (min/d) above specific thresholds. AlZahal et al. (2011) suggested that the threshold 38.8°C could be of a diagnostic significance for the detection of SARA in nonfebrile dairy cows. Neither this threshold nor other greater thresholds (39.2 and 39.6°C) varied between LF and HF goats in our study (Table 5.2).

Nevertheless, rumen temperature increased ($P < 0.001$) by 0.82 and 1.25°C at 30 and 60 min after feeding, respectively, due to the increase in fermentation activity. Rumen temperature remained elevated until the time of water drinking, when rumen temperature dramatically fell by 3.42 and 3.51°C ($P < 0.001$) at 30 and 60 min after drinking (Figure 5.6). Values of rumen temperature were recovered and were similar ($P = 0.645$) to the pre-feeding values at approximately 2 h after drinking. Then, rumen temperatures gradually increased and were greater ($P < 0.05$) than the pre-feeding value, but never reached the pre-drinking values because feed was restricted and no new feed was introduced into the digestive system after drinking. During the last 3.5 h before the following meal, rumen temperature slowly decreased in accordance with the reduction in ambient and body temperatures and were similar ($P = 0.135$ to 0.812) to those of pre-feeding values (Figure 5.6).

Our goats drank on average 3.9 ± 0.7 L/d (10% BW) of cold water ($9.8 \pm 0.4^\circ\text{C}$) within 5 to 10 min. The decrease in rumen temperature after drinking in the current study (-3.4°C at 30 min) was much lower than that reported by Bewley et al. (2008) in dairy cows (-8.5°C at 15 min) drenched 25 L (4% BW approximately) of cold water (7.6°C). In the later study, rumen temperature recovered at 3.5 h after water drenching, but in our results values returned to normal range by 2 h. It should be taken into account that boluses in the study of Bewley et al. (2008) were located in the reticulum, whereas in our goats boluses were in the ventral sac, which might explain differences in the magnitude of temperature reduction after drinking. We

detected a positive correlation ($r = 0.59$; $P < 0.05$) between the amount of water drunk (2.6 to 5.8 L) and the decrease in rumen temperature (-2.4 to -5.6 °C) at 30 min after water consumption.

. Because rumen temperature increased and rumen pH decreased after feeding, there was a negative correlation ($r = -0.33$; $P < 0.05$) between both parameters in our results, which agrees with those reported by Wahrmund et al. (2012) and Lohölter et al. (2013) in cows. This inverse relationship between rumen pH and rumen temperature could be used to predict the rumen pH as previously indicated by AlZahal et al. (2009). Rumen temperature has been used for the detection of SARA in dairy cows (AlZahal et al., 2011).

Figure 5.6 Rumen pH (○ and ●) and rumen temperature (△ and ▲) of non-lactating goats fed 70% forage (○, △; n = 10) or 30% forage (●, ▲; n = 10). The solid arrow indicates time of feed withdrawal and the open arrow indicates dinking time. The SEM values were 0.03 and 0.13 for rumen pH and temperature, respectively.

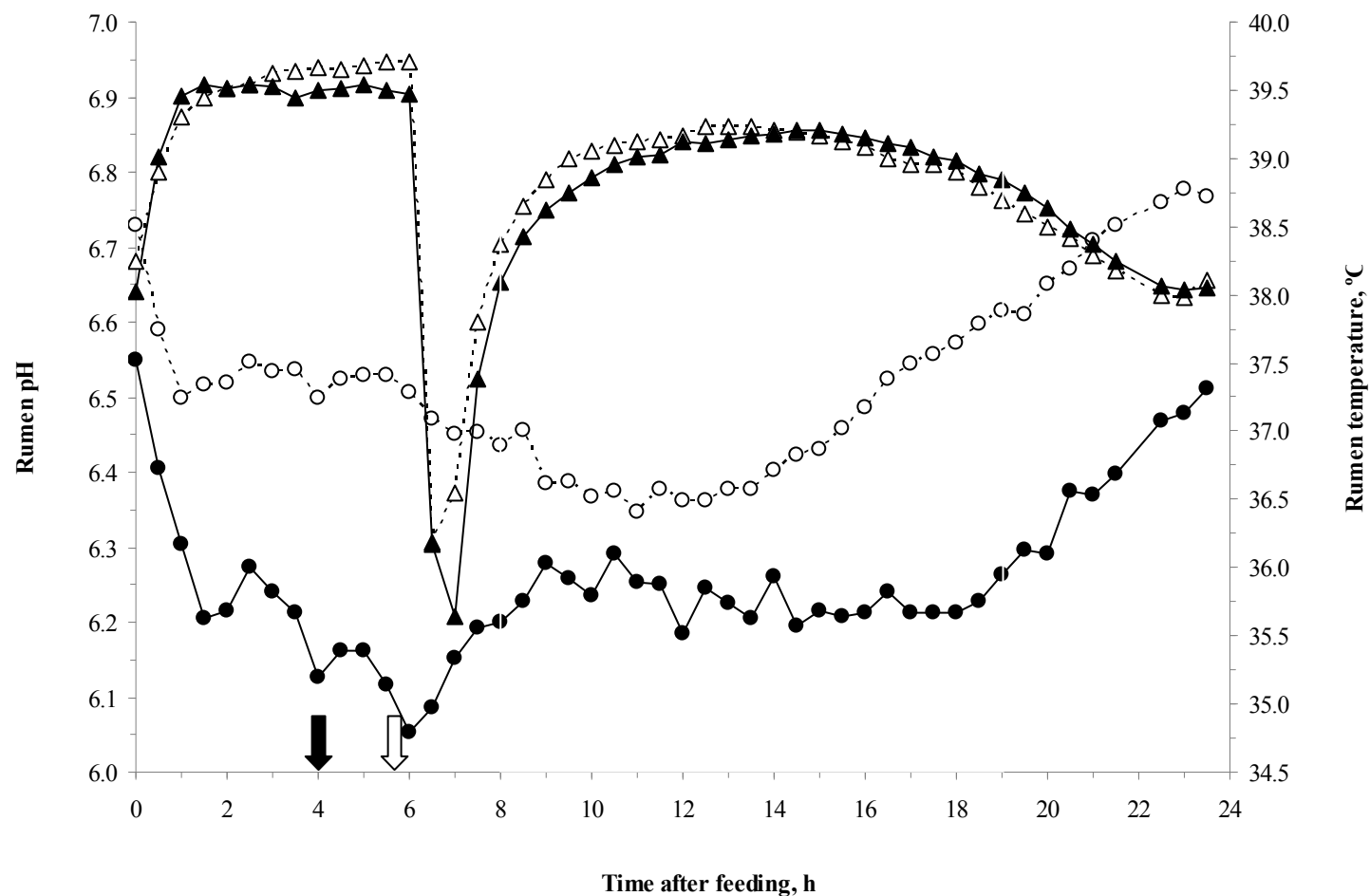
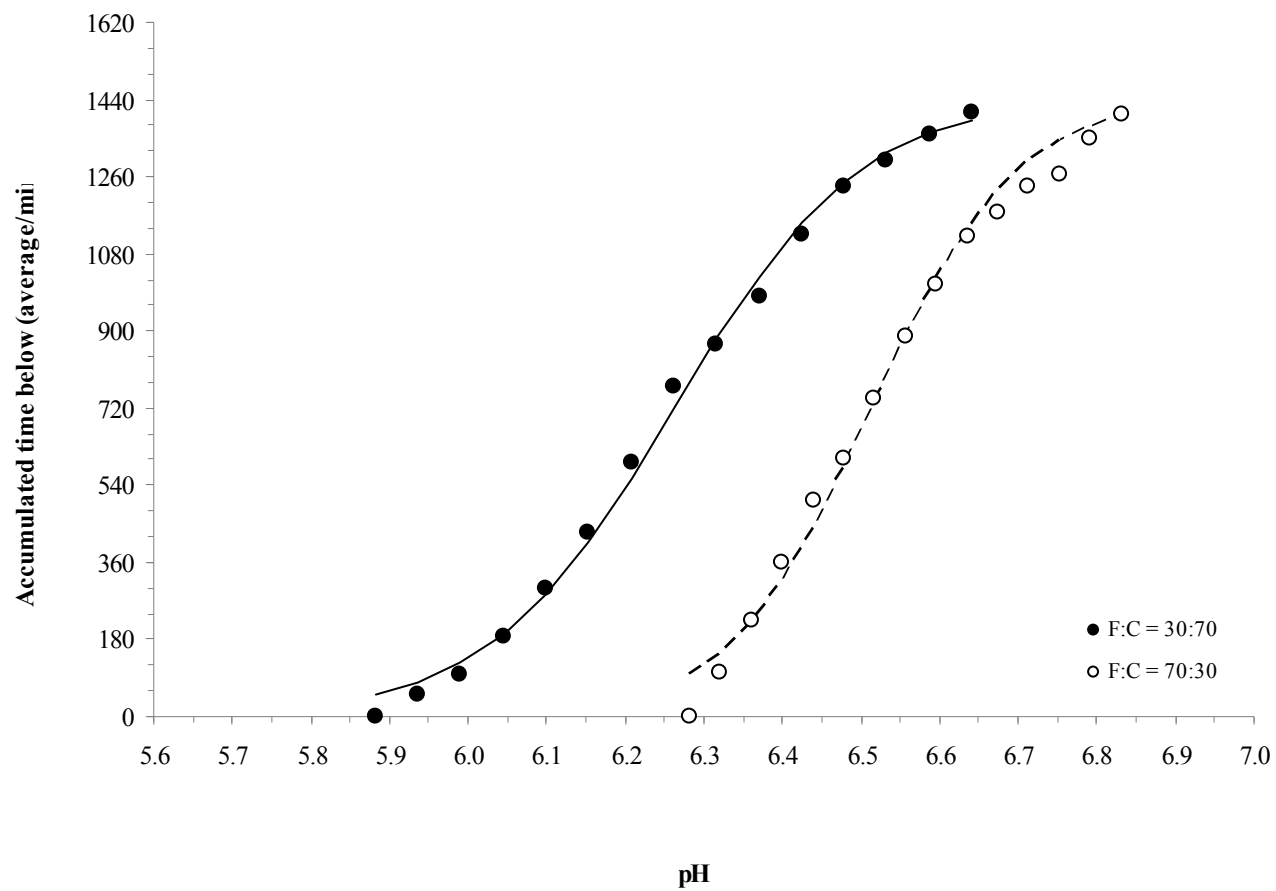


Figure 5.7 pH curves for high (\circ) and low (\bullet) forage diets in non-lactating dairy goats. The y-axis represents the accumulated time (min/d) spent below each corresponding pH point on the x-axis. Dashed lines represent slopes of pH curves.



5.4.3.1.2 Rectal temperature and relationship with ruminal temperature

In the current study, rectal temperature was measured at -2.5 , $+2.0$ and $+5.5$ h relative to feeding time. No differences were detected between both groups in rectal temperature (Table 5.2), but the values increased ($P < 0.01$) by time (37.5 , 38.4 , 38.8 °C at 0900, 1300, and 1700 h, respectively) because of heat produced after feeding and in accordance with the elevation in the ambient temperature throughout the day (from 10 to 16 °C). In accordance, AlZahal et al. (2011) observed no effect of diet on vaginal temperature.

Rumen temperatures were on average 0.92 ± 0.06 °C greater than rectal temperatures due to microbial fermentation, and increased ($P < 0.001$) by time (38.2 , 39.5 , and 39.6 °C at 900, 1300, and 1700 h, respectively). Consequently, a high correlation ($r = 0.91$; $P < 0.001$) was detected between both rectal and ruminal temperatures agreeing Bewley et al. (2008).

5.4.3.2 Experiment 2

5.4.3.2.1 Feed intake

Feed intake of our goats did not vary by effect of ambient conditions (Table 5.3). In lactating dairy goats fed ad libitum, losses in DMI due to HS stress range between 20 and 35% according to stage of lactation (Hamzaoui et al., 2012, 2013). In our study, the goats were non-lactating and fed at the maintenance level, so lower differences in DMI were expected. The TN goats gained 1.3 kg ($+63$ g/d), whereas HS goats lost 1.4 kg (-67 g/d) of BW (Table 5.3). Although they eat similar amount of DM, requirements of TN goats were well covered, whereas HS goats suffered a shortage and lost BW. It was expected that maintenance requirements under HS conditions were greater than under TN conditions, and this should be taken into account in ration formulation for heat-stressed animals. Increase in maintenance requirements was necessary to cover the needs for extra activities related to muscle movements for panting, greater sweating, increased chemical reactions in the body, and the production of heat shock proteins that consumed large amounts of ATP (Salama et al., 2013).

Table 5.3 Body weight, DM and water intakes, respiration rate, rectal and rumen temperatures, and rumen pH of non-lactating goats under thermal neutral (TN, n = 8) or heat stress (HS, n = 8) conditions. Values are least squares means and SE of the difference.

Item	Treatment			Effect (<i>P</i> =)		
	TN	HS	SED	Treatment	Period	T × P ¹
Initial BW, Kg	43.1	44.7	1.6	0.267	0.241	0.120
Final BW, Kg	44.4	43.3	1.4	0.469	0.287	0.080
BW change, kg	+1.3	-1.4	1.1	0.033	0.013	0.633
DMI, kg/d	1.13	0.98	0.10	0.183	0.944	0.971
Water consumption, L/d	2.2	5.4	0.7	0.002	0.238	0.960
Respiration rate, breaths/min	28	105	5	0.001	0.322	0.428
Rectal temperature, °C	38.6	39.0	0.1	0.001	0.276	0.134
Rumen temperature, °C	39.6	39.9	0.1	0.004	0.445	0.721
Rumen pH	6.55	6.43	0.04	0.003	0.001	0.450

¹Interaction treatment × period.

5.4.3.2.2 Ruminal pH and temperature

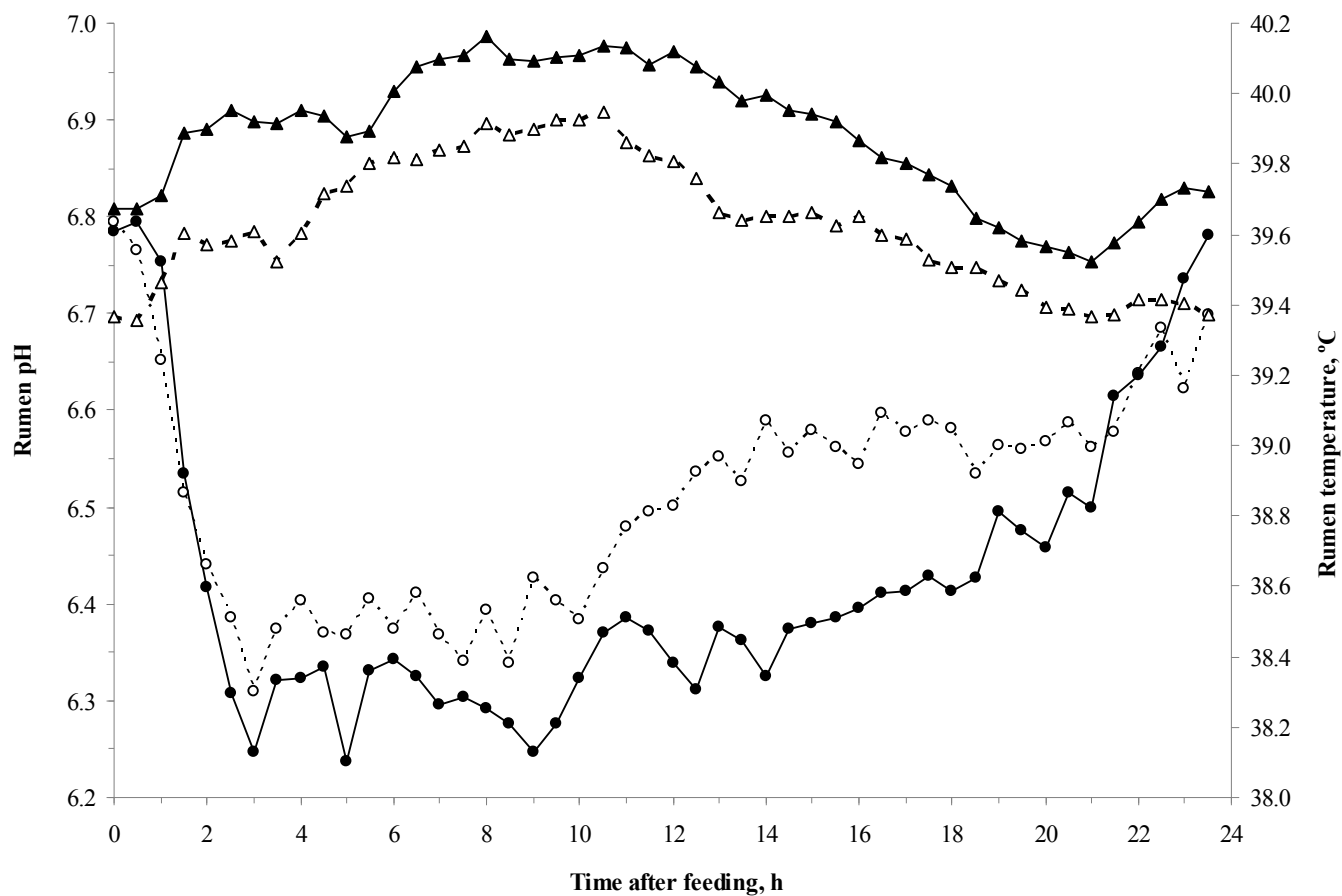
Although TN and HS goats were fed the same diet and had similar DMI, average rumen pH was 0.12 units lower in HS than in TN ($P < 0.01$; Table 5.3). At all time points, pH was similar between treatments, except at 12 to 18 h post-feeding when HS goats had lower rumen pH (-0.21 ± 0.05 units; $P < 0.001$) compared to TN goats (Figure 5.8). This time interval (i.e., 12 to 18 h post-feeding) was during the night (shaded area in Figure 5.8) and it is possible that HS goats had new bouts of feeding during night hours when ambient temperature decreased from 37 to 30 °C, resulting in lower rumen pH. Mishra et al. (1970), and Bandaranayaka and Holmes (1976) reported that rumen pH decreased by HS in cows fed similar amount of DM. Rumen pH decreased by 0.51 ± 0.05 units on average at 3 h after feeding in TN and HS goats. No TN goat had rumen pH < 6.0 , whereas only 2 HS goats had pH = 5.96 for 180 min.

The HS goats had greater ($+0.30$ °C; $P < 0.01$) rumen temperature than TN goats (Table 5.3) in accordance with the high ambient temperature under which HS animals were kept. Rectal temperature values were also greater ($+0.43$ °C; $P < 0.01$) in HS goats. As far as we

know, rumen temperature has not been evaluated in farm animals under thermo-neutral and heat stress conditions. There was no interaction ($P = 0.998$) treatment by day hour for rumen temperature. Compared to the value before feeding, rumen temperatures increased ($P < 0.01$) by $+0.23$ °C at 1.5 h and peaked ($+0.52$ °C; $P < 0.001$) at 8 h post-feeding, and then gradually decreased and was not significant at 16.5 h after feeding.

As water was freely available at ambient temperature, no dramatic decreases in rumen temperatures were observed (Figure 5.8) like those occurred in Exp. 1 when goats drank large amount of cold water once daily.

Figure 5.8 Ruminal pH (○ and ●) and ruminal temperature (△ and ▲), of non-lactating goats under thermal neutral (○, △; n = 8) or heat stress (●, ▲; n = 8) conditions. The shaded area indicates night time (2100 to 900 h) during which ambient temperature was reduced from 37 to 30 °C for heat-stressed goats. Outside this time interval, heat-stressed goats were exposed to 37 °C. The SEM values were 0.05 and 0.14 for rumen pH and temperature, respectively.



5.4.3.2.3 Digestibility coefficients

Digestibility coefficients did not vary between TN and HS goats, although the HS group had numerically greater values of the coefficients (Table 5.4). Previous results with lactating goats under HS conditions and fed ad libitum showed an improvement (+3 to +9 points) in the digestibility of DM, CP, NDF, and ADF (Hamzaoui et al., 2013a,b). Moreover, HS increased digestibility in male goats (Hirayama et al., 2004), dairy cows (McDowell et al., 1969), and heifers (Bernabucci et al., 1999). In all mentioned studies, feed intake decreased by HS which might explain the increment of digestibility as a consequence of depressed passage rate of the solid phase of digesta as reported by Bernabucci et al. (1999). In the current study, DMI was similar between groups, and consequently differences in digestibilities were minimal.

Table 5.4 Digestibility coefficients of non-lactating goats under thermal neutral (TN, n = 8) or heat stress (HS, n = 8) conditions. Values are least squares means and SE of the difference.

Item	Treatment			Effect (<i>P</i> =)		
	TN	HS	SED	Treatment	Period	T × P ¹
DM	75.8	77.7	2.2	0.421	0.326	0.373
OM	78.3	79.8	2.1	0.513	0.359	0.425
CP	77.4	79.1	2.0	0.423	0.183	0.178
NDF	51.1	56.6	4.2	0.230	0.279	0.737
ADF	50.1	52.6	4.8	0.211	0.164	0.875

¹Interaction treatment × period.

5.4.3.2.4 Blood parameters measurement

Although HS goats lost BW, they were able to maintain similar blood glucose and urea to TN goats (Table 5.5), which is similar to previously observed in lactating goats fed ad libitum (Hamzaoui et al., 2013a). Moreover blood pH was similar, despite the increment in respiration rate (Table 5.3). An increase in respiration rate is an important thermoregulatory response to

HS, and aids in heat dissipation through evaporative cooling (Blackshaw and Blackshaw, 1994; Beatty et al., 2006). However, increased alveolar ventilation contributed to a greater loss of CO₂ in blood of HS goats (Table 5.5), shifting the equilibrium of HCO₃⁻ that decreased in blood with the aim of maintaining blood pH constant. A similar mechanism has been reported in cows (Schneider et al., 1988; Calamari et al., 2007) and goats (Hamzaoui et al., 2013a).

Table 5.5 Metabolic and acid-base balance indicators of non-lactating goats under thermal neutral (TN, n = 4) or heat stress (HS, n = 4) conditions. Values are least squares means and SE of the difference.

Item	Treatment		SED	Effect (<i>P</i> <)
	TN	HS		
Glucose, mg/dL	57.7	55.0	5.2	0.630
Urea, mg/dL	14.3	13.3	1.8	0.571
Na, mmol/L	149	152	1	0.021
K, nmol/L	3.47	3.83	0.30	0.292
Cl, mmol/L	111	119	2	0.017
Hematocrit, %PCV ¹	18.3	15.3	1.0	0.032
Hemoglobin, mmol/L ²	6.23	5.18	0.37	0.034
pH	7.45	7.47	0.02	0.510
Total CO ₂ , mmol/L ²	30	22	2	0.009
Anion gap, mmol/L ²	12.7	15.5	1.1	0.044
PCO ₂ , mm Hg	42	29	3	0.006
HCO ₃ ⁻ , mmol/L ²	28.8	21.1	1.8	0.007
Base excess ²	4.67	-2.75	1.97	0.013

¹Packed cell volume.

²Calculated values by the i-STAT device software.

Hematocrit and hemoglobin values were lower (*P* < 0.05) in HS than TN goats (Table 5.5). Weldy et al. (1964) reported a significant negative correlation (*r* = -0.44) between blood cell volume and rectal temperature in dairy cows under HS conditions. It seems that increased

water consumption by HS (Table 5.3) caused hemodilution effect where more water is transported in the circulatory system for evaporative cooling.

5.4.4 Conclusions

The ruminal pH and temperature sensors used recorded a large amount of data in the non-lactating dairy related to the feeding and environmental changes to which they were submitted. Continuous recording was necessary to measure the amount of time spent below critical pH or temperature points, which could add further complexity to the interpretation of rumen function changes. The data obtained by sensors could also reflect animal activity and changes in its behavior (i.e., feeding and drinking bouts) as shown in our results. By mean of these sensors, we were able to detect a lower rumen pH in heat-stressed goats, even they had similar feed intake to goats under thermal neutral conditions. This could indicate a shift in rumen fermentation and absorption of metabolites across rumen wall under heat stress conditions which needs further research.

5.5 THE USE OF LOGISTIC REGRESSIONS AND CUMULATIVE NORMAL DISTRIBUTIONS TO MODEL RUMEN PH AND TEMPERATURE CHANGES IN DAIRY GOATS. (Uso de regresión logística y distribución normal acumulativas para predecir la temperatura y el pH ruminal en cabras lecheras)

Resumen

Los objetivos de este estudio fueron modelar el pH y la temperatura ruminal utilizando la regresión logística y la distribución normal acumulativa, para comparar estos modelos, y evaluar si elevadas temperaturas ambientales y la administración de suplementos de aceites funcionales afectan estas relaciones. Ocho cabras lecheras no-lactantes Murciano-Granadina se asignaron al azar para 2 tratamientos distintos de ración (C: control; AF: complementado con aceites funcionales) y 2 condiciones de temperatura (TN: termo neutralidad, ET: estrés por calor). El experimento consistió en 2 periodos consecutivos de 3 semanas durante la cual el pH y la temperatura del rumen se registraron a cada 30 minutos utilizando un sistema de radiofrecuencia con biosensores en forma de bolo. Los coeficientes de la regresión logística para el pH y la temperatura predijeron con exactitud la cinética del pH y la temperatura. Sin

embargo, el uso de una distribución normal acumulativa, utilizando la media y los valores de la desviación estándar, también fue un modelo de predicción precisa, que no requiere la estimación anterior de cualquier parámetro. El punto más bajo de la temperatura diaria (nadir) y el pH medio del rumen fueron predichos con más exactitud por la desviación estándar de la temperatura, que por los coeficientes de la regresión logística). Además, el uso de la temperatura o de la desviación estándar de la temperatura ruminal para predecir el pH ruminal mostró serias limitaciones, como en el caso del efecto de productos o circunstancias que alteren la cinética ruminal o la fermentación de forma independiente la temperatura o al pH del rumen. La suplementación con AF y las condiciones de ET tendieron a disminuir el punto más bajo del pH del rumen, independientemente de la temperatura del rumen. En conclusión, el uso de regresiones logísticas sólo mejoró ligeramente la exactitud de las predicciones de pH ruminal respecto al uso de las distribuciones normales acumulativas. Además, la desviación estándar de la temperatura del rumen fue el mejor predictor del punto más bajo del pH ruminal. Sin embargo, los factores que modifican de forma independiente el pH y la temperatura ruminal disminuyeron considerablemente la exactitud de la predicción.

Abstract

The objectives of this study were to model rumen pH and temperature using logistic regressions and cumulative normal distributions, to compare these models, and to assess whether high ambient temperatures and the supplementation of functional oils affect these relationships. Eight Murciano-Granadina non-lactating dairy goats were randomly allocated to 2 dietary treatments (C, control; FO, supplemented with functional oils) and to 2 temperature conditions (TN, thermo-neutral; HS, heat stress). The experiment consisted of 2 consecutive periods of 3 wk during which rumen pH and temperature were recorded every 30 min using rumen bolus sensors by radiofrequency. The logistic regression coefficients for the ruminal pH and temperature accurately predicted pH and temperature kinetics. However, the use of a cumulative normal distribution, using the average and the standard deviation values, was also an accurate prediction model, which did not require the previous estimation of any parameter. The standard deviation of the rumen temperature was more accurate predicting daily temperature nadir and average pH than the temperature or the logistic regression coefficients. Also, the use of either the rumen temperature or the standard deviation of the rumen

temperature to predict ruminal pH showed serious limitations, as products or circumstances that change ruminal kinetics or fermentation can independently affect rumen temperature or pH. Supplementation with FO increased and HT conditions tended to decrease the nadir of rumen pH, independently of rumen temperature. In conclusion, the use of logistic regressions only marginally improved the accuracy of rumen pH predictions over the use of cumulative normal distributions. Also, the standard deviation of rumen temperature was the best predictor of rumen pH nadir. However, factors that modify rumen pH and temperature independently considerably decreased the accuracy of the prediction.

5.5.1 Introduction

Ruminal temperature has been used to predict nadir ruminal pH (AlZahal et al., 2008). This prediction assumes that a faster fermentation will increase the accumulation of VFA and decrease pH. However, some products modify rumen fermentation and decrease some fermentation end products (e.g., lactic acid) that may have a large impact on ruminal pH. For example, some plant oils that have been labeled “functional oils” because they have biological activities beyond their energy value (Bess et al., 2012), have been shown to decrease intake variability in high concentrate feedlot diets (Devant et al., 2012). As increases in intake variability have been related to ruminal acidosis (Schwartzkopf-Genswein et al., 2003), it is possible that the functional oils affect ruminal pH and/or temperature. Also, the supplementation of buffers or other environmental factors like heat stress that change ruminal dilution rates and ruminal pH (Kadzere et al., 2002) have not been studied in relation to their effects on the relationship of ruminal temperature and pH.

Ruminal pH has been modeled using logistic curves (AlZahal et al., 2007a). However, cumulative normal distributions do not require the calculation of any coefficients and can also be used to model both ruminal pH. Both, logistic curves and cumulative normal distribution can also be applied to model ruminal temperature and assess the relationship among the pH and temperature coefficients and how different factors may affect ruminal pH and temperature.

The objectives of this study were to assess: 1) the relationship between ruminal temperature and ruminal pH, 2) the information yielded by logistic regressions and

cumulative normal distributions on the relationship between ruminal pH and temperature and 3) how heat stress and the supplementation of functional oils affect those relationships.

5.5.2 Materials and Methods

The treatment procedures and animal care conditions were reviewed and approved by the Ethical Committee on Animal and Human Experimentation of the Universitat Autònoma de Barcelona (reference CEEAH 11/1166) and the codes of recommendations for the welfare of livestock of the Ministry of Agriculture, Food and Environment of Spain.

5.5.2.1 Animals and Management Conditions

Eight adult non-lactating Murciano-Granadina goats (43.9 ± 1.0 kg of BW) housed in metabolic cages at the Experimental Farm (SGCE) of the Universitat Autònoma de Barcelona (Bellaterra, Spain), were used in this study.

The study consisted of a 2×2 (diet \times ambient temperature) factorial design with experimental periods lasting 3 wk (2 wk of dietary adaptation and 1 wk of data collection) in which does were randomly assigned to one dietary treatment (**C**, control; **FO**, supplemented with functional oils) and submitted to 2 different ambient temperature (**TN**, thermo-neutral; **HS**, heat stress) according to the experimental period (I or II). The FO supplementation consisted of a commercial mixture of cashew nut shell liquid and castor oil (Essential, Oligo Basics Agroindustrial Ltda., Cascavel, Brazil) fed at 0.05% on a DM basis. Goats were offered a diet at maintenance level (29 g/kg BW) consisting of 50% forage (alfalfa hay, 1.22 Mcal EN_L/kg and 20.0% CP; DM basis) and 50% concentrate (barley grain, 1.80 EN_L/kg /kg and 10.8% CP, DM basis) with or without FO according to their treatment once a day (12:00 h). Whereas does in thermo-neutral conditions were kept in a barn (21.5 ± 0.3 °C and 45% relative humidity), does under heat stress were kept inside a climatic chamber (day, 37.0 ± 0.5 °C and 50% humidity; night, 30 ± 0.5 °C, 50% humidity; Hamzaoui et al., 2013). The photoperiod was maintained constant in a 12-12 day-night cycle during the experiment. Water at room temperature and mineral blocks (Ovi bloc, Sal Cupido, Terrassa, Spain) were permanently available in the cages.

5.5.2.2 Wireless Ruminal Boluses

Rumen pH and temperature were measured continuously using rumen bolus sensors (145 × 27 mm, model KB1001, Kahne, Auckland, New Zealand), recorded every 30 min and stored in the bolus sensor. Boluses were placed in the rumen of each goat by surgery and removed at the end of the experiment. The data were downloaded at the end of each experimental period to a laptop computer using a wireless portable radio frequency system (433.9 MHz) consisting of a trigger device (Kahne Wand, KW1) and a stationary unit (top KR2001 receiver), used for capturing the data signals send by the rumen boluses, provided of a large antenna (Yagi antenna, KR2002, Khane) placed at approximately 1 m from the rumen. The data were then exported to an Excel spreadsheet (Microsoft Office 2010; Microsoft Corp., Redmond, WA, 2010) using a specific software (Kahne Data Processing System v.5.2.4).

5.5.2.3 Calculations and Statistical Analysis

The daily average of the weekly accumulated time (min/d) spent below pH or temperature cut-off points was calculated for each goat and pH and temperature curves were constructed for each animal. As the daily upper limit of the LR was already known (1.440 min), only the slope and the inflection needed to be estimated. Initially, several scatterplots prepared with Excel showed that the averages and the standard deviations of the pH and the temperature could be used as predictors of, respectively, the inflection point and the slope, and were included in posterior analyses. The hypothesis that CND might also be good models to fit rumen pH and temperature curves derived from: 1) both the average and the standard deviation were predictors of LR coefficients; 2) LR resembled CND; and, 3) rumen pH and temperature data were normally distributed.

Although the CND could be considered more complex mathematically than the LR, it has the advantage that standard spreadsheet programs (i.e., Microsoft Excel) have a function that returns the probability of a value being below a certain cut-off point. The time below a certain cut-off point is obtained by multiplying that value by the number of daily minutes (1.140 min) or hours (24 h). Therefore, the use of a CND makes the estimation of any parameters unnecessary, as the average and the standard deviation are already known. A LR was fitted to pH and temperature curves from each individual animal as done by AlZahal et al. (2007a)

using the Solver Tool in Microsoft Excel (Harris, 1998). The CND functions were fitted using the actual averages and the standard deviation. Also, the Solver Tool in Excel was used to estimate the CND functions and to compare the estimated and actual values.

All statistical analyses were performed with OpenStat version 3.23.08 (<http://www.statprograms4u.com/>). Regressions, simple or multiple, with and without the inclusion of FO supplementation and HS as dummy variables were calculated to predict nadir and average rumen pH from rumen temperature variables.

5.5.3 Results and Discussion

Coefficients of determination for the LR were always above 0.96 for rumen pH and above 0.95 for rumen temperature. Higher inflection values indicate higher averages and in our analyses, inflection values were extremely close to actual pH and temperature averages. When the inflection points were used as predictors of rumen pH and temperature averages, determination coefficients were very high ($r^2 > 0.99$) and slopes very close to 1. The slope values in LR models are related to rumen stability throughout the day. The higher the value, the more stable ruminal pH and temperature are. Therefore, rumen conditions with low slopes and inflection values are associated with acidotic animals (Colman et al., 2012).

For both pH and temperature, the inverse of the standard deviation accurately predicted the inflection point through linear regression, being the r^2 above 0.97 in both cases (Figures 5.9 and 6.0). A possible outlier in the pH regression could be yielding an artificially high r^2 . For this reason, this data point was taken out of the regression analysis to assess whether it changed the regression. However, the coefficients with and without the possible outlier were very similar and the coefficient of determination was still high ($r^2 = 0.85$), so the point was kept in the analysis. It makes biological sense for the inflection point to be related to the standard deviation, because wide ranges in pH and temperature will increase the standard deviation and should, therefore, decrease the inflection values.

Cumulative normal distributions, using actual averages and standard deviations, yielded an r^2 above 0.96 for the pH and above 0.95 for the temperature. When the average and the standard deviation were estimated, the coefficients of determination improved slightly ($r^2 > 0.97$ and $r^2 > 0.96$ for the pH and the temperature, respectively).

The animals used in this experiment were not suffering from acidosis (never more than 3 h with ruminal pH below 5.6) and the pH ranges were small, so more experiments over wider pH ranges should be performed to see whether these results are repeatable. However, in this experiment, the slope and the inflection points were predicted very accurately using the standard deviation and the average of the rumen pH and temperature, and in this case, the use of LR was not better than the use of CND.

Figure 5.9 Relationship between the average values of ruminal pH (●) or ruminal temperature (○) and the slope coefficients (b) of the logistic regression ($y = a / [1 + e^{-(b+cx)}]$) used in their respective pH or temperature predictive equations.

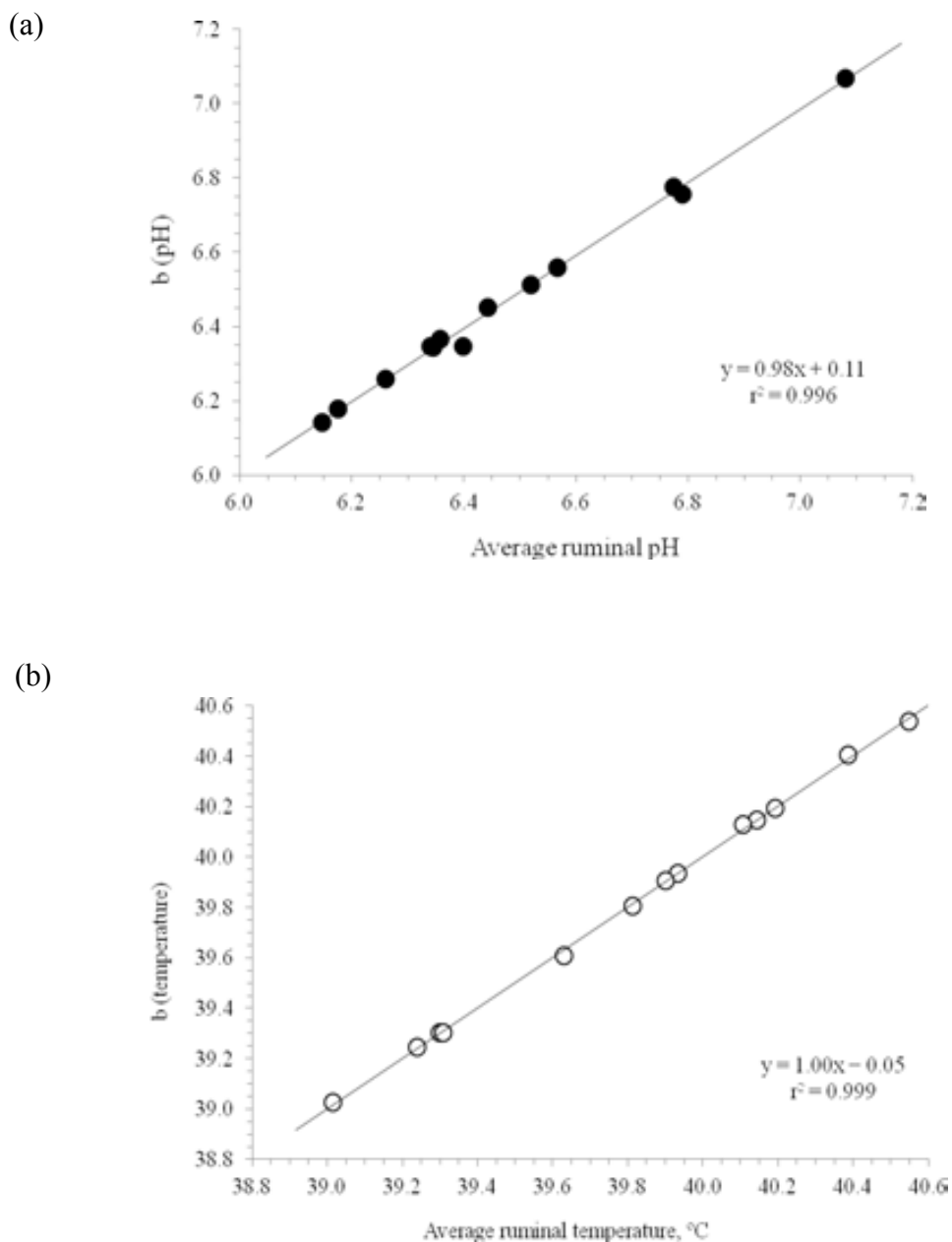
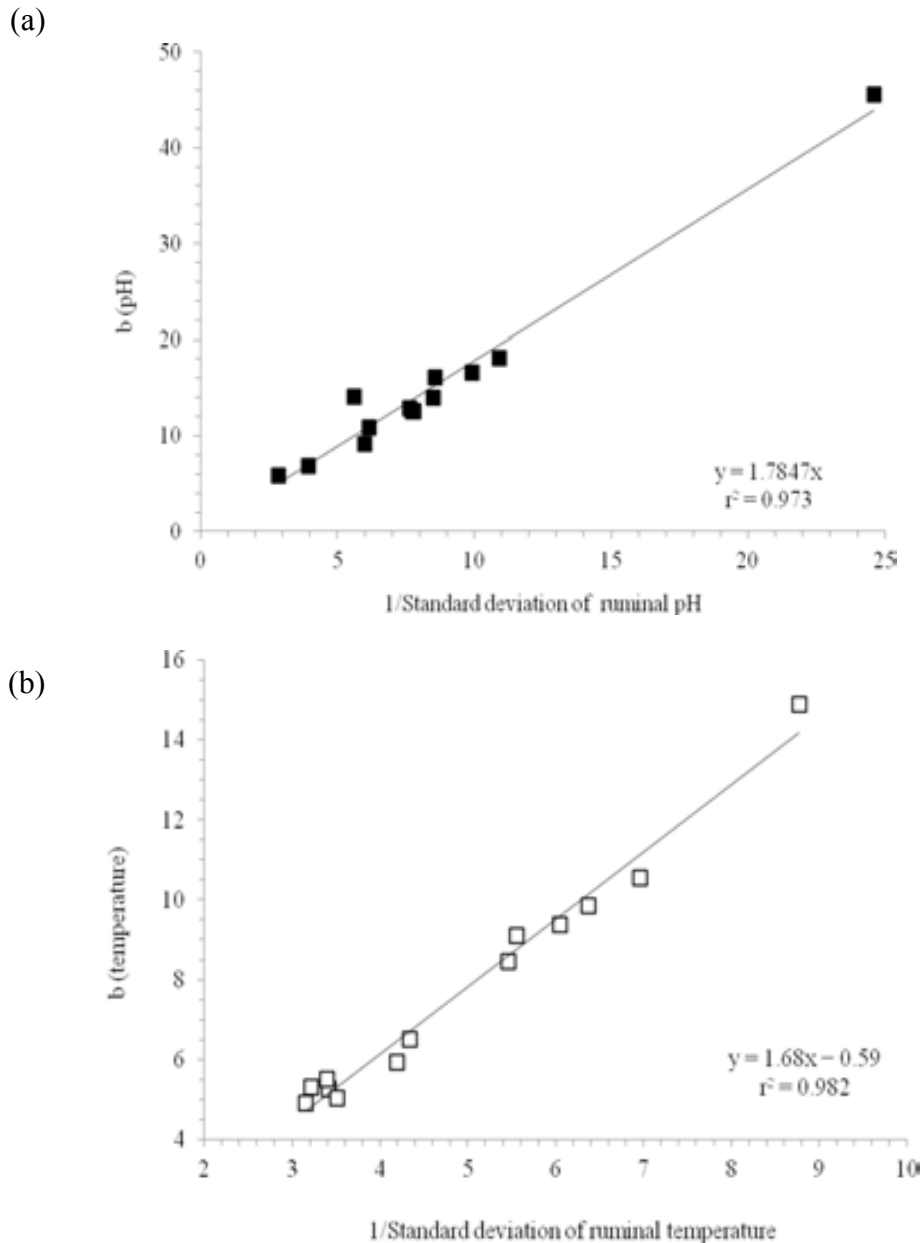


Figure 6.0 Relationship between the 1/standard deviation values of ruminal pH (■) or ruminal temperature (□) and the slope coefficients (b) of the logistic regression ($y = a / [1 + e^{-(b+cx)}]$) used in their respective pH or temperature predictive equations.



An exploratory analysis showed that neither the rumen temperature slopes nor the inflection points were significantly correlated to either the rumen pH slopes nor the inflection points. Also, whereas the rumen temperature slope showed only a tendency to be correlated to the nadir rumen pH ($r = 0.509$; $P = 0.076$), the standard deviation of the rumen temperature was correlated to the nadir rumen pH ($r = -0.578$; $P = 0.039$) and showed a tendency to be

correlated with the average rumen pH ($r = -0.550$; $P = 0.051$). Although, neither the maximum nor the average rumen temperatures were good predictors of either the average or the nadir rumen pH, and despite being obtained in non-lactating dairy goats, the coefficients of the regression equation were very similar to those previously reported by AlZahal et al. (2007a) in dairy cows (16.9 ± 2.04 and 0.29 ± 0.05). These authors used cows fed high levels of fermentable carbohydrates and this might have allowed for greater pH and temperature variability and more correlation strength in their study ($r^2 = 0.77$). However, the standard deviation of rumen temperature was a better predictor than the temperature itself, improving the accuracy of the equation ($r^2 = 0.33$; $P = 0.039$; Table 5.6) in our experiment. Interestingly, when ambient temperature conditions and FO supplementation were included in the regression analyses as dummy variables, the accuracy of the regression increased remarkably (Table 5.6). On one hand, the addition of FO increased nadir rumen pH ($P = 0.002$) and on the other hand, HS showed a tendency to decrease it ($P = 0.086$). The comparison of FO and C goats showed that when rumen temperatures or when the standard deviation of the rumen temperature were equal, the rumen pH of FO supplemented goats was higher ($P = 0.010$). Heat stress analyses only showed a tendency ($P = 0.086$) to decrease nadir pH when the standard deviation of the rumen temperature were equal, but logically, if nadir rumen pH was decreased, a decrease in average rumen pH should also be expected. These results agree with previous research showing that HS decreases rumen pH in dairy cows (Kadzere et al., 2002; West, 2003).

The fact that both FO and HS might be shifting the regression lines indicated that the rumen temperature and the standard deviation of the rumen temperature have strong limitations when used as the sole predictors of rumen average or nadir rumen pH. These factors seemed to affect the rumen fermentation heat and the rumen pH independently, so changes in rumen temperature due to these factors do not necessarily translated into changes in rumen pH.

The fact that both FO and HS might be shifting the regression lines indicated that the rumen temperature and the standard deviation of the rumen temperature have strong limitations when used as the sole predictors of rumen average or nadir rumen pH. These factors seemed to affect the rumen fermentation heat and the rumen pH independently, so changes in rumen temperature due to these factors do not necessarily translated into changes in rumen pH.

Table 5.6 Regression equations for predicting nadir and average rumen pH from rumen temperature values in dairy goats.

Equation	r^2	$P =$
Nadir pH		
$16.1 (\pm 6.00)^1 - 0.25 (\pm 0.15) \times RT^2$	0.20	0.127
$6.77 (\pm 0.27) - 2.68 (\pm 1.14) \times RTSD^3$	0.33	0.039
$6.86 (\pm 0.17) - 3.43 (\pm 0.75) \times RTSD + 0.45 (\pm 0.11) \times FO^4 - 0.19 (\pm 0.10) \times AT^5$	0.79	0.002
$20.51 (\pm 4.79) - 0.36 (\pm 0.12) \times RT + 0.46 (\pm 0.14) \times FO - 0.16 (\pm 0.13) \times AT$	0.64	0.021
Average pH		
$19.94 (\pm 6.32) - 0.34 (\pm 0.16) \times RT + 0.38 (\pm 0.15) \times FO - 0.03 (\pm 0.13) \times AT$	0.47	0.111
$6.99 (\pm 0.17) - 2.72 (\pm 0.76) \times RTSD + 0.34 (\pm 0.11) \times FO - 0.08 (\pm 0.10) \times AT$	0.67	0.015

¹Standard error of the mean; ²Rumen temperature (°C); ³Rumen temperature standard deviation; ⁴Diets: control (FO = 0) or supplemented with functional oils (FO = 1); ⁵Ambient temperature conditions: thermo-neutral (AT = 0) or heat stress (AT = 1).

Despite the limitations of the rumen temperature as a predictor of rumen pH, it still yields important information. For example, from our data of rumen temperature one could hypothesize that FO changed the rumen microbial populations to those producing less acidotic end products (i.e., decreasing lactic acid production), as their dietary supplementation increased the average and nadir rumen pH. However, this hypothesis would need further research to be proven.

5.5.4 Conclusions

In conclusion, as the average and the standard deviation of rumen pH and temperature yield as much information as the use of LR, the use of a CND might be an easier way to model rumen pH. Also, the standard deviation of the rumen temperature predicted rumen pH more accurately than rumen temperature. However, the use of either rumen temperature or the standard deviation rumen temperature to predict rumen pH has serious limitations, as products or circumstances that change ruminal kinetics or fermentation can independently affect rumen pH and temperature. Despite these limitations, the study of the relationships among rumen pH and temperature is still helpful in explaining the effects of different factors modifying rumen function.

CAPÍTULO 6: CONCLUSIONES

CAPÍTULO 6

CONCLUSIONES

Las conclusiones obtenidas en las distintas experiencias llevadas a cabo en la presente Tesis Doctoral corresponden a las siguientes:

6.1 CONCLUSIONES ESPECÍFICAS

6.1.1 Termografía por infrarrojos

- El uso de la termografía de infrarrojos, pese a la sensibilidad de la cámara utilizada para distinguir cambios en la temperatura de la ubre entre razas de ovejas y momentos de ordeño, no resultó de utilidad para detectar la aparición de mamitis clínicas o subclínicas en las medidas realizadas en condiciones de granja.
- Esta conclusión se vio reforzada por la ausencia de una variación significativa de temperatura en una muestra de ovejas a las que se indujo una respuesta inflamatoria aguda en la ubre por medio de la infusión de endotoxina de *E. coli*.
- Se han identificado otras aplicaciones de interés (tales como la evaluación de los efectos de los equipos de ordeño y de la hipertermia inducida por el estrés de manejo) que deberán ser exploradas en futuras investigaciones.

6.1.2 Biosensores ruminales de pH y temperatura

- Los bolos ruminales utilizados, equipados con sensores de pH y temperatura y de tecnología por radiofrecuencia, pese a su relativo gran tamaño para pequeños rumiantes, fueron preferidos a la realización de cánulas ruminales permanentes y satisfactoriamente tolerados por cabras lecheras tras su introducción quirúrgica en el rumen.
- Los valores de pH y temperatura ruminales obtenidos mediante los bolos ruminales equipados con sensores mostraron una reducida deriva en el tiempo y permitieron la obtención de valores ruminales de forma continua a lo largo del día, sin alterar aparentemente el ambiente ruminal o el comportamiento del animal en comparación con la toma de muestras mediante sistemas tradicionales.

- El uso de bolos ruminales con sensores permitió mostrar claras diferencias en el pH del rumen ruminal en respuesta a raciones extremas en la relación forraje:concentrado en cabras a nivel de mantenimiento. El pH del rumen fue inferior en las raciones con mayor proporción de concentrado, aunque no llegó a rebasar el límite indicativo de acidez subaguda (pH = 5.6).
- Por el contrario, no se detectaron efectos de las características de la ración en la temperatura del rumen, aunque los sensores mostraron marcadas diferencias en la temperatura ruminal a lo largo del día en las cabras alimentadas a nivel de mantenimiento. De forma especial, se detectaron cambios marcados en la temperatura del rumen tras la ingestión de agua fría, lo que puede comprometer la función ruminal y necesita posterior estudio.
- El uso de sensores ruminales en cabras alimentadas con raciones semejantes y sometidas a condiciones extremas de temperatura ambiente, permitió detectar un descenso del pH del rumen como consecuencia de las adaptaciones metabólicas producidas por el estrés térmico. De forma similar, los sensores de temperatura mostraron diferencias en la temperatura del rumen que se correlacionó con la temperatura rectal y la temperatura ambiente.
- La predicción del pH del rumen a partir de la temperatura ruminal resultó adecuada utilizando la distribución normal acumulativa en lugar de regresiones sigmoideas, mas difíciles de calcular. No obstante, el uso exclusivo de la temperatura para su predicción fue poco preciso, necesitando de la inclusión de otras variables externas relacionadas tales como la temperatura ambiente y la utilización de suplementos funcionales capaces de alterar el metabolismo ruminal.

6.2 CONCLUSIÓN GENERAL

La utilización de sistemas telemétricos en ganadería ofrece interesantes posibilidades que permitirán desarrollar nuevas estrategias nutricionales y de manejo de forma que se optimice la función ruminal y los resultados productivos en ganadería. La línea de trabajo que inicia esta tesis debería ser continuada en el futuro explorando nuevas aplicaciones. De una forma especial se destaca el uso de bolos ruminales equipados con sensores que pueden ser utilizados para la medida de parámetros digestivos en sustitución de las cánulas ruminales.

CAPÍTULO 7: BIBLIOGRAFIA

CAPÍTULO 7

BIBLIOGRAFÍA

- Adams, D., and M. McKinley. 2009. The Sheep. ANZCCART Fact Sheet A9, Adelaide, Australia. Requirements of Small Ruminants.
- Aljumaah, R. S., E. M. Samara, and M. Ayadi. 2012. Influence of introducing machine milking on biothermal parameters of lactating camels (*Camelus dromedarius*). *Italian J. Anim. Sci.* 11:e73.
- AlZahal, O., E. Kebreab, J. France, and B. W. McBride. 2007a. Mathematical approach to predicting biological values from ruminal pH measurements. *J. Dairy Sci.* 90: 3777–3785.
- AlZahal, O., B. Rustomo, N. E. Odongo, T. F. Duffield, and B. W. McBride. 2007b. Technical note: A system for continuous recording of ruminal pH in cattle. *J. Anim. Sci.* 85:213–217.
- AlZahal, O., E. Kebreab, J. France, M. Froetschel, and B.W. McBride. 2008. Ruminal temperature may aid in the detection of subacute acidosis. *J. Dairy Sci.* 91: 202–207.
- AlZahal, O., M. A. Steele, E. V. Valdes, and B. W. McBride. 2009. Technical note: The use of a telemetric system to continuously monitor ruminal temperature and to predict ruminal pH in cattle. *J. Dairy Sci.* 92:5697–5701.
- AlZahal, O., H. AlZahal, M. A. Steele, M. Van Schaik, I. Kyriazakis, T. F. Duffield, and B. W. McBride. 2011. The use of a radiotelemetric ruminal bolus to detect body temperature changes in lactating dairy cattle. *J. Dairy Sci.* 94:3568–3574.

- AOAC. 2003. Official Methods of Analysis of AOAC international. Vol. I. 17th ed. Maryland, USA.
- Bandaranayaka, D. D, and C. W. Holmes. 1976. Changes in the composition of milk and rumen contents in cows exposed to a high ambient temperature with controlled feeding. *Trop. Anim. Health Prod.* 8:38-46.
- Barth, K. 2000. Basic investigations to evaluate a highly sensitive infrared-thermograph technique to detect udder inflammation in cows. *Milk Sci. Int.* 55:607–609.
- Baumgard, L.H., Rhoads, R.P., 2013. Effects of heat stress on postabsorptive metabolism and energetics. *Annu. Rev. Anim. Biosci.* 1, 311–337.
- Beatty, D.T., A. Barnes, E. Taylor, D. Pethick, M. McCarthy and S. K. Maloney. 2006. Physiological responses of *Bos taurus* and *Bos indicus* cattle to prolonged, continuous heat and humidity. *J. Anim. Sci.* 84:972–985.
- Beauchemin, K. A. 2007. Ruminant acidosis in dairy cows: balancing physically effective fibre with starch availability. *Florida Ruminant Nutrition Symposium*:16-27.
- Berger, Y., P. Billon, F. Bocquier, G. Caja, A. Cannas, B. McKusick, P-G. Marnet, and D. Thomas. 2004. Fundamentals of sheep dairying in North America. Cooperative Extension Publishing, University of Wisconsin-Extension, Madison WI.
- Bernabucci, U., P. Bani, B. Ronchi, N. Lacetera, and A. Nardone. 1999. Influence of short- and long-term exposure to a hot environment on rumen passage rate and diet digestibility by Friesian heifers. *J. Dairy Sci.* 82:967–973.
- Berry, R. J., A. D. Kennedy, S. L. Scott, B. L. Kyle, and A. L. Schaefer. 2003. Daily variation in the udder surface temperature of dairy cows measured by infrared thermography: Potential for mastitis detection. *Can. J. Anim. Sci.* 83:687–693.

- Bess, F., A. Favero, S. L. Vieira, and J. Torrent. 2012. The effects of functional oils on broiler diets of varying energy levels. *J. Appl. Poult. Res.* 21: 567–578.
- Bewley, J. M., M. W. Grott, M. E. Einstein, and M. M. Schutz. 2008. Impact of intake water temperatures on reticular temperatures of lactating dairy cows. *J. Dairy Sci.* 91: 3880–3887.
- Bianca, W. 1976. The significance of meteorology in animal production. *International Journal of Biometeorology.* 20: 139–156.
- BIPM. 1993. International vocabulary of basic and general terms in metrology, VIM. ISO, Ginebra.
- Blackshaw, J. K., and A. W. Blackshaw. 1994. Heat stress in cattle and the effect of shade on production and behaviour: A review. *Aust. J. Exp. Agric.* 34:285–295.
- Boutinaud, M., C. Rousseau, D. H. Keisler, and H. Jammes. 2003. Growth hormone and milking frequency act differently on goat mammary gland in late lactation. *J. Dairy Sci.* 86:509–520.
- Bouwknicht, J. A., B. Olivier, and R. E. Paylor. 2007. The stress-induced hyperthermia paradigm as a physiological animal model for anxiety: a review of pharmacological and genetic studies in the mouse. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 31:41-59.
- Calamari, L., F. Abeni, F. Calegari, and L. Stefanini. 2007. Metabolic conditions of lactating Friesian dairy cows during the hot season in the Po valley. 2. Blood minerals and acid-base chemistry. *Int. J. Biomet.* 52:97–107.
- Callejo, J. C. A, D. R. Perez, C. S. M. Pastrana. 2009. Curso Basico de Teledetección. Available online at <http://ocw.innova.uned.es/ocwuniversia/tecnologias-del-medio-ambiente/curso-basico-de-teledeteccion/curso/material/historia-de-la-teledeteccion.pdf>.

- Cantalapiedra-Hijar, G., D. R. Yáñez-Ruiz, A. I. Martín-García, and E. Molina-Alcaide. 2008. Effects of forage:concentrate ratio and forage type on apparent digestibility, ruminal fermentation, and microbial growth in goats. *J. Dairy Sci.* 87:622–631.
- Carmona, J. F. 1987. *Bioclimatología Animal*. Ed. Secretaria General Técnica, Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación. Madrid, España.
- Chapinal, N., A. M. de Passille, M. Pastell, L. Hanninen, L. Munksgaard, and J. Rushen. 2011. Measurement of acceleration while walking as an automated method for gait assessment in dairy cattle. *J. Dairy Sci.* 94:2895–2901.
- Church, D.C. 1979. *Digestive Physiology and Nutrition of Ruminants - Digestive Physiology*. 2th ed. Practical Nutrition. Corvallis, Oregon.
- Church, D.C. 1988. *El Rumiente, Fisiología Digestiva y Nutrición*. Ed. Acribia, S.A. Zaragoza, España.
- Chuvieco, E. 1995. *Teledetección ambiental, la observación de la Tierra desde el Espacio*. 2ª ed. Editorial Ariel, Madrid. 528 pp.
- Colak, A., B. Polat, Z. Okumus, M. Kaya, L. E. Yanmaz, and A. Hayirli. 2008. Short communication: Early detection of mastitis using infrared thermography in dairy cows. *J. Dairy Sci.* 91:4244–4248.
- Colman, E., B. M. Tas, W. Waegeman, B. De Baets, and V. Fievez. 2012. The logistic curve as a tool to describe the daily ruminal pH pattern and its link with milk fatty acids. *J. Dairy Sci.* 95: 5845–5865.
- Cooper-Prado, M. J., N. M. Long, E. C. Wright, C. L. Goad and R. P. Wettemann. 2011. Relationship of ruminal temperature with parturition and estrus of beef cows. *Anim. Sci.* 89:1020–1027.

- Cordes, D. and U. Borchert. 2012. Modern trends of milking systems to support udder health - case study Herd Navigator (TM). *Arch. Lebensm.hyg.* 63(3):65-67.
- Curtis, S. E. 1983. *Environmental Management in Animal Agriculture*. Iowa State University Press. Ames, Iowa, USA.
- D'Alterio, G., S. Casella, M. Gatto, M. Giancesella, G. Piccione, and M. Morgante. 2011. Circadian rhythm of foot temperature assessed using infrared thermography in sheep. *Czech J. Anim. Sci.* 56:293–300.
- Dehghani, S.N., and Ghahrdani A.M. 1995. Bovine rumenotomy: Comparison of four surgical techniques. *Can. Vet. J.* 36: 693–697.
- Devant, M., A. Aris, A. Bach, and J. Torrent. 2012. Effect of a blend of castor oil and cashew nut shell liquid on performance, eating pattern, rumen health and carcass quality in Holstein bulls fed high-concentrate rations. *J. Anim. Sci.* 90(Suppl.3), 243.
- De Veth, M.J. and E.S. Kolver. 1999. Pasture digestion in response to change in ruminal pH. *Proceedings of the New Zealand Society of Animal Production* 59:66-69.
- Duffield, T., J. C. Plaizier, A. Fairfield, R. Bagg, G. Vessie, P. Dick, J. Wilson, J. Aramini, and B. McBride. 2004. Comparison of techniques for measurement of rumen pH in lactating dairy cows. *J. Dairy Sci.* 87:59–66.
- Eigenberg, R.A., T.M. Brown-Brandl, and J.A. Nienaber. 2008. Sensors for dynamic physiological measurements. *Computers and electronics in agriculture* 6 2: 41–47.
- Enemark, J. M. D., G. Peters, and R. J. Jørgensen. 2003. Continuous monitoring of rumen pH – A case study with cattle. *J. Vet. Med.* 50: 62–66.
- Eriksson, A., K. Persson Waller, K. Svennersten-Sjaunja, J.-E. Haugen, F. Lundby, and O. Lind. 2005. Detection of mastitic milk using a gas-sensor array system (electronic nose). *Int. Dairy J.* 15:1193–1201.

- Feynman, R. (1959) There's plenty of room at the bottom. A talk given at the annual meeting of the American Physical Society at the California Institute of Technology, December 29, 1959. A full transcript of the lecture can be found at www.zyvex.com/nanotech/feynman.html.
- Fuquay, J.W. 1981. Heat stress as it affects production. *J. Anim. Sci.* 52:167–174.
- Garret, E. F., M. N. Pereira, K. V. Nordlund, L. E. Armentano, W. J. Goodger, and G. R. Oetzel. 1999. Diagnostic methods for the detection of subacute ruminal acidosis in dairy cows. *J. Dairy Sci.* 82:1170–1178.
- Gasteiner, J., M. Fallast, S. Rosenkranz, J. Häusler, K. Schneider, and T. Guggenberger. 2009. Measuring rumen pH and temperature by an indwelling and wireless data transmitting unit and application under different feeding conditions. *Precision Livestock Farming.* 9:127–133.
- Gasteiner, J., T. Guggenberger, J. Häusler, and A. Steinwidder. 2012. Continuous and long-term measurement of reticulo-ruminal pH in grazing dairy cows by an indwelling and wireless data transmitting unit. *Vet. Med. Inter.* 1–7.
- Geishauser, T. 1993. An instrument for the collection and transfer of ruminal fluid and for the administration of water-soluble drugs in adult cattle. *Bovine Pract.* 27:38–42.
- Giger-Reverdin, S., P. Morand Fehr, D. Sauvant. 2011. Water intake of dairy goats in intensive systems. *Options Méd., Série A*, 99, 233–237.
- Gonzalo, C., M. A. Blanco, C. Palacios, A. Martínez, E. Beneitez, F. González, M. T. Juárez, J. C. Granado. 2004. Buenas Prácticas ganaderas, control de riesgos y sistemas integrales de calidad y seguridad alimentaria en las explotaciones lecheras de ganado ovino y caprino. Consorcio de Promoción del Ovino, Villalpando, Zamora. 149 pp.

- Hamzaoui, S., A.A.K. Salama, G. Caja, E. Albanell, X. Such. 2013a. Supplementation with soybean oil increases milk fat and improves milk fatty acid profile in heat-stressed dairy goats. *J. Dairy Sci.* 96(E-Suppl. 1), 124.
- Hamzaoui, S., A.A.K. Salama, E. Albanell, X. Such, G. Caja. 2013. Physiological responses and lactational performances of late lactating dairy goats under heat stress conditions. *J. Dairy Sci.* (In press).
- Harris, D. C. 1998. Nonlinear least-squares curve fitting with Microsoft Excel Solver. *J. Chem. Educ.* 75: 119-121.
- Hassanat, F., R. Gervais, C. Julien, D. I. Massé, A. Lettat, P. Y. Chouinard, H. V. Petit, and C. Benchaar. 2103. Replacing alfalfa silage with corn silage in dairy cow diets: Effects on enteric methane production, ruminal fermentation, digestion, N balance, and milk production. *J. Dairy Sci.* 96:1–15.
- Hicks, L. C., W. S. Hicks, R. A. Bucklin, J. K. Shearer, D. R. Bray, P. Soto, and V. Carvalho. 2001. Comparison of methods of measuring deep body temperature of dairy cows. Pages 432–438 in 6th Int. Symp. ASAE, Louisville, KY. Am. Soc. Agric. Biol. Eng., St. Joseph, MI.
- Hirayama, T., Katoh, K., Obara, Y., 2004. Effects of heat exposure on nutrient digestibility, rumen contraction and hormone secretion of goats. *Anim. Sci. J.* 75, 237-243.
- Hogeveen, H., C. Kamphuis, W. Steeneveld, and H. Mollenhorst. 2010. Sensors and clinical mastitis—the quest for the perfect alert. *Sensors*10: 7991-8009.
- Hovinen, M., J. Siivonen, S. Taponen, L. Hanninen, M. Pastell, A. M. Aisla, and S. Pyörälä. 2008. Detection of clinical mastitis with the help of a thermal camera. *J. Dairy Sci.* 91:4592–4598.

- Hovinen, M. 2009. Udder health of dairy cows in automatic milking. MSci Thesis. University of Helsinki, Helsinki, Finland.
- Hovinen, M., S. Pyörälä. 2011. Invited review: Udder health of dairy cows in automatic milking. . Dairy Sci. 94:547–562.
- Hungate, R.E. 1966. The Rumen and its microbes. Academic Press INC. New York.
- IDF (International Dairy Federation). 2009. Environmental / Ecological Impact of the Dairy Sector: Literature review on dairy products for an inventory of key issues List of environmental initiatives and influences on the dairy sector. Brussels, Belgium.
- INRA. 2007. Alimentation des bovins, ovins et caprins. Quae, Paris, France.
- IPCC (Intergovernmental Panel on Climate Change) 2007. Climate Change 2007: Impacts, Adaptation and Vulnerability Summary for policy makers. Available online at http://www.meteotrentino.it/clima/pdf/rapporti_meteo/IPCC_Impacts_Adaptation_and_Vulnerability.pdf
- Ipema, A.H., D. Goense, P.H. Hogewerf, H.W.J. Houwers, and H. van Roest. 2008. Pilot study to monitor body temperature of dairy cows with a rumen bolus. Computers and electronics in agriculture 64: 49–52.
- Kadzere, C. T., M. R. Murphy , N. Silanikove , and E. Maltz. 2002. Heat stress in lactating dairy cows: a review. Livest. Prod. Sci. 77: 59–91.
- Kahne. 2010. User Guide: KB1000 kahne Bolus Series. Auckland, New Zealand.
- Kamphius, C., D. Pietersma, R. van der Tol, M. Wiedemann, and H. Hogeveen. 2008. Using sensor data patterns from an automatic milking system to develop predictive variables for classifying clinical mastitis and abnormal milk. Comput. Electron. Agric. 62:169–181.

- Kamphuis, C.; Mollenhorst, H.; Heesterbeek, J.A.P.; Hogeveen, H. 2010. Detection of clinical mastitis with sensor data from automatic milking systems is improved by using decision-tree induction. *J. Dairy Res.*, 93: 3616–3627.
- Kaur, R., S. C. Garcia, A. Horadagoda, and W. J. Fulkerson. 2010. Evaluation of rumen probe for continuous monitoring of rumen pH, temperature and pressure. *Anim. l Prod. Sci.* 50, 98–104.
- Kelly, R. O., F. A. Martz, and H. D. Johnson. 1967. Effect of environmental temperature on ruminal VFA levels with controlled feed intake. *J. Dairy Sci.* 50:531–533.
- Kotschi, J., and K. Müller-Sämman. 2004. The Role of Organic Agriculture in Mitigating ClimateChange: A Scoping Study. Bonn, Germany: IFOAM. Available online at <http://www.environmentportal.in/files/ClimateStudy%20IFOAM%20Screen.pdf>.
- Kunc, P., I. Knížková, M. Přikryl, J. Maloun. 2007. Infrared thermography as a tool to study the milking process: a review. *Agricultura Tropica et Subtropica.* 40: 29–32.
- Lam, T. J. G. M., B.H.P. van den Borne, J. Jansen, K. Huijps, J. C. L. van Veersen, G. van Schaik, H. Hogeveen. 2013. Improving bovine udder health: A national mastitis control program in the Netherlands. *J. Dairy Sci.* 96:1301–1311.
- Lampila, M. (1955). Preliminary studies on the variations of pH and volatile fatty acid concentration in the rumen contents of the cow. *J. Scientific Agric. Soc. Finland* 27, 142–153.
- Lehtolainen, T., S. Suominen, T. Kutila, and S. Pyörälä. 2003. Effect of intramammary *Escherichia coli* endotoxin in early- vs. late-lactating dairy cows. *J. Dairy Sci.* 86:2327–2333.

- Leitner, G., M. Chaffer, A. Shamay, F. Shapiro, U. Merin, E. Ezra, A. Saran, and N. Silanikove. 2004. Changes in milk composition as affected by subclinical mastitis in sheep. *J. Dairy Sci.* 87:46–52.
- Leitner, G., U. Merin, L. Lemberskiy-Kuzin, D. Bezman, and G. Katz. 2012. Real-time visual/near-infrared analysis of milk-clotting parameters for industrial applications. *Animal* 6(7):1170-1177.
- Lohölter, M., R. Rehage, U. Meyer, P. Lebzien, J. Rehage, and S. Dänicke. 2013. Evaluation of a device for continuous measurement of rumen pH and temperature considering localization of measurement and dietary concentrate proportion. *Appl Agric Forestry Res.* 63: 61–68
- Loughmiller, J.A., M. F. Spire, S. S. Dritz, B. W. Fenwick, M. H. Hosni, S. B. Hogge. 2001. Relationship between mean body surface temperature measured by use of infrared thermography and ambient temperature in clinically normal pigs and pigs inoculated with *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *Am. J. Vet. Res.* 62:5.
- Martins, R. F. S., T. P. Paim, C. A. Cardoso, B. S. L. Dallago, C. B. de Melo, H. Louvandini, C. McManus. 2013. Mastitis detection in sheep by infrared thermography. *Res. Vet. Sci.* 94:722–724.
- Matcher, R., G. Borghi, and V. Beghelli, 1957: Sulla tecnica di determinazione del ph del contenuto ruminale. *Arch. Vet. Ital.* 8, 513–534.
- McDougall, S., P. Murdough, W. Pankey, C. Delaney, J. Barlow, and D. Scruton. 2001. Relationships among somatic cell count, California mastitis test, impedance and bacteriological status of milk in goats and sheep in early lactation. *Small Rumin. Res.* 40:245–254.

- McDowell, R. E., E. G. Moody, P. J. Van Soest, R. P. Lehmann, and G. L. Ford. 1969. Effect of heat stress on energy and water utilization of lactating cows. *J. Dairy Sci.* 52:188–194.
- McGavin, D. and J. F. Zachary. 2007. *Pathologic Basis of Veterinary Disease*. 4th ed. Mosby Elsevier, St. Louis, MO.
- Mitchel, M. A. 2013. Thermal imaging in Physiology: Theoretical and practical considerations. Pages 47–65 in *Thermography: Current Status and Advances in Livestock Animals and in Veterinary Medicine*. F. Luzi, M. A. Mitchell, L. Nanni Costa and V. Redaelli, ed. Fondazione Iniziative Zooprofilattiche e Zootecniche-Brescia, Brescia, Italy.
- Mishra, M., F. A. Martz, R. W. Stanley, H. D. Johnson, J. R. Campbell and E. Hilderbrand. 1970. Effect of Diet and Ambient Temperature-Humidity on Ruminal pH, Oxidation Reduction Potential, Ammonia and Lactic Acid in Lactating Cows *J. Anim. Sci.* 30:1023–1028.
- Morand-Fehr, P. and M. Doreau. 2001. Ingestion et digestion chez les ruminants soumis à un stress de chaleur. *INRA Prod. Anim.* 14:15-27.
- Mottram, T., J. Lowe, M. McGowan, N. Phillips. 2008. Technical note: A wireless telemetric method of monitoring clinical acidosis in dairy cows. *Comput. Electr.. Agric.* 64:45–48.
- Mullins, C. R., L. K. Mamedova, M. J. Brouk, C. E. Moore, H. B. Green, K. L. Perfield, J. F. Smith, J. P. Harner, and B. J. Bradford. 2012. Effects of monensin on metabolic parameters, feeding behavior, and productivity of transition dairy cows. *J. Dairy Sci.* 95:1323–1336.

- Murgia, L., C. Stelletta, M. Caria, M. Giancesella, M. Gatto, A. Pazzona, and M. Morgante. 2008. Using infrared thermography to monitor the effect of different milking vacuum levels on teat tissue in dairy ewes. *Internat. Conf. Agric. Eng.*, Hersonissos, Greece, 23-25 June. 131–139.
- Nagl, L.; R. Schmitz, S. Warren, T.S. Hildreth, H. Erickson, D. Andresen. 2003. Wearable sensor system for wireless state-of-health determination in cattle, In 25th IEEE EMBS Conference, Cancun, Mexico, September 17-21. Cancun, Mexico.
- Nordlund, K.V., E. F. Garrett. 1994. Rumenocentesis: A technique for collecting rumen fluid for the diagnosis of subacute rumen acidosis in dairy herds. *The Bovine Practitioner*. 28:109–112.
- NRC. 1971. *A Guide to Environmental Research on Animals*. Washington, DC. National Academy Press.
- Olde Riekerink, R. G. M., H. W. Barkema, D. F. Kelton, D. T. Scholl. 2008. Incidence rate of clinical mastitis on Canadian dairy farms. *J. Dairy Sci.* 91:1366–1377.
- Paustian, K., M. Antle, J. Sheehan, P. Eldor. 2006. *Agriculture's Role in Greenhouse Gas Mitigation*. Washington, DC: Pew Center on Global Climate Change.
- Penner, G. B., K. A. Beauchemin, and T. Mutsvangwa. 2006. An Evaluation of the Accuracy and Precision of a Stand-Alone Submersible Continuous Ruminant pH Measurement System. *J. Dairy Sci.* 89:2132–2140.
- Penner, G. B., J. R. Aschenbach, G. Gäbel, and M. Oba. 2009. Technical note: Evaluation of a continuous ruminal pH measurement system for use in noncannulated small ruminants. *J. Anim. Sci.* 87:2363–2366.

- Pezeshki, A., P. Stordeur, H. Wallemacq, F. Schynts, M. Stevens, P. Boutet, L. J. Peelman, et al. 2011. Variation of inflammatory dynamics and mediators in primiparous cows after intramammary challenge with *Escherichia coli*. *Vet. Res.* 42:15.
- Phillips, N., T. Mottram, D. Poppi, D. Mayer, and M. R. McGowan. 2010. Continuous monitoring of ruminal pH using wireless telemetry. *Animal Production Science* 50: 72–77.
- Piccione, G., and G. Caola. 2003. Influence of shearing on the circadian rhythm of body temperature in the sheep. *J. Vet. Med. A* 50:235–240.
- Pinilla, C. R. 1995. Elementos de teledetección. RA-MA Editorial. Madrid. España.
- Polat, P., A. Colak , M. Cengiz , L. E. Yanmaz, H. Oral, A. Bastan, S. Kaya, and A. Hayirli. 2010. Sensitivity and specificity of infrared thermography in detection of subclinical mastitis in dairy cows. *J. Dairy Sci.* 93:3525–3532.
- Rebhun, W.C. 1995. *Diseases of Dairy Cattle*. Lea and Febiger Book. Williams & Wilkins, Media, PA.
- Revillas, S.M. 2011. *Guía de la termografía infrarroja: Aplicaciones en ahorro y eficiencia energética*. Dirección General de Industria, Energía y Minas de la Comunidad de Madrid. Móstoles, Madrid, España.
- Rivas-Martínez, Salvador (2004). **Global bioclimatics (Clasificación bioclimática de la Tierra)**. <http://www.globalbioclimatics.org>.
- Rose-Dye, T. K., L. O. Burciaga-Robles, C. R. Krehbiel, D. L. Step, R. W. Fulton, A. W. Confer, and C. J. Richards. 2010. Rumen temperature change monitored with remote rumen temperature boluses following challenges with Bovine Viral Diarrhea Virus and *Mannheimia haemolytica*. *Anim. Sci.* 89:1193–1200.

- Rutten, C. J., A. G. J. Velthuis, W. Steeneveld, and H. Hogeveen. 2013. Invited review: Sensors to support health management on dairy farms. *J. Dairy Sci.* 96:1928–1952.
- Saint-Dizier, M., and S. Chastant-Maillard. 2011. Towards an automated detection of oestrus in dairy cattle. *Reprod. Domest. Anim.* 47:1056–1061.
- Salama, A.A.k, G. Caja, S. Hamzaoui, B. Badaoui, A. Castro-Costa, D.A.E Façanha , M.M. Guilhermino, and Bozzi. 2013. Different levels of response to heat stress in dairy goats. *Small Rumin. Res.* (Accepted).
- Sato, S, M. Hitoshi, I. Kazunori, I. Kentaro, K. Atushi, and O. Keiji. 2012. Technical note: Development and testing of a radio transmission pH measurement system for continuous monitoring of ruminal pH in cows. *Preventive Vet. Med.* 103:274–279.
- Schneider, P. L., D. K. Beede, and C. J. Wilcox 1988. Nycterohemeral patterns of acid-base status, mineral concentrations and digestive function of lactating cows in natural or chamber heat stress environments. *J. Anim. Sci.* 66:112–125.
- Scott, S. L., A. L. Schaefer, A. K. W. Tong, and P. Lacasse. 2000. Use of infrared thermography for early detection of mastitis in dairy cows. *Can. J. Anim. Sci.* 80:764. (Abstr.).
- Schwartzkopf-Genswein, K. S., K. A. Beauchemin, D. J. Gibb, D. H. Crews Jr., D. D. Hickman, Streeter M., and T. A. McAllister. 2003. Effect of bunk management on feeding behavior, ruminal acidosis and performance of feedlot cattle: A review. *J. Anim. Sci.* 81:E149-E158.
- Silanikove, N., A. Shamay, D. Sinder, and A. Moran. 2000. Stress down regulates milk yield in cows by plasmin induced β -casein product that blocks K^+ channels on the apical membranes. *Life Sci.* 67:2201–2212.

- Silva, R.G. and A.S.C. Maia. 2013. Principles of Animal Biometeorology. Springer. Dordrecht, Netherlands.
- Smith, V. R. (1941). In vivo studies of hydrogen ion concentrations in the rumen of the dairy cow. *J. Dairy Sci.* 24: 659–665.
- Sufka, K. J, and R. A. Hughes. 1991. Differential effects of handling on isolation-induced vocalizations, hypoalgesia, and hyperthermia in domestic fowl. *Physiology & Behavior* 50:129–133.
- Tajima, K., I. Nonaka, K. Higuchi, N. Takusari, M. Kurihara, A. Takenaka, M. Mitsumori, H. Kajikawa, R. I. Aminov. 2007. Influence of high temperature and humidity on rumen bacterial Diversity in Holstein heifers. *Anaerobe* 13: 57–64
- Vegricht, J., A. Machálek, P. Ambrož, U. Brehme, and S. Rose. 2007. Milking-related changes of teat temperature caused by various milking machines. *Res. Agr. Eng.* 53: 121–125.
- Vickers, L. A., O. Burfeind, M. A. G. von Keyserlingk, D. M. Vieira, D. M. Weary, and W. Heuwieser. 2010. Comparison of rectal and vaginal temperatures in lactating dairy cows. *J. Dairy Sci.* 93:5246–5251.
- Viguier, C., S. Arora, N. Gilmartin, K. Welbeck, and R. O’Kennedy. 2009. Mastitis detection: Current trends and future perspectives. *Trends Biotechnol.* 27:486–493.
- Vollmer, M., K.P. Möllmann. 2011. Infrared thermal imaging: fundamentals, research and applications. Hoboken, NJ : Wiley.
- Wahrmund, J. L., J. R. Ronchesel, C. R. Krehbiel, C. L. Goad, S. M. Trost, and C. J. Richard. 2012. Ruminant acidosis challenge impact on ruminal temperature in feedlot cattle. *J. Anim. Sci.* 90:2794–2801.

- Wales W.J., E.S. Kolver, P.L. Thorne, and A.R. Egan. 2004. Diurnal variation in ruminal pH on the digestibility of highly digestible perennial ryegrass during continuous culture fermentation. *J. Dairy Sci.* 87:1864–1871.
- West, J. W. 2003. Effects of Heat-Stress on Production in Dairy Cattle. *J. Dairy Sci.* 86:2131–2144.
- Willard, S., S. Dray, R. Farrar, M. McGee, S. Bowers, A. Chromiak, and M. Jones. 2007. Use of infrared thermal imaging to quantify dynamic changes in body temperature following lipopolysaccharide (LPS) administration in dairy cattle. *J. Anim. Sci.* 85(Suppl. 2):26 (Abstr.).
- Zosel, J., H. Kaden, G. Peters, M. Hoffmann, P. Rudisch, L. Jäkel, G. Lauckner, A. Grodrian, U. Guth. 2010. Continuous long-term monitoring of ruminal pH. *Sensors and Actuators.* 144:395–399.