



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO

FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES

MAESTRIA EN SALUD Y PRODUCCIÓN
ANIMAL SUSTENTABLE

Efecto del tratamiento térmico de los pasteurizadores de granja sobre la calidad sanitaria del calostro en hatos lecheros

T E S I S

Que como parte de los requisitos para obtener el grado de:
Maestra en Salud y Producción Animal Sustentable

Presenta:

IBt. OSIRIS LIZBETH GARCÍA MALDONADO

Dirigido por:

DR. FELICIANO MILIÁN SUAZO

Co-dirigido por:

M. en C. BEATRIZ LILIANA ÁLVAREZ MAYORGA

Dr. FELICIANO MILIÁN SUAZO

Presidente

M. en C. BEATRIZ LILIANA ÁLVAREZ MAYORGA

Secretario

DR. GERMINAL JORGE CANTÓ ALARCÓN

Vocal

M. EN C. SUSANA SOSA GALLEGOS

Suplente

DRA. MARÍA CONCEPCIÓN MENDÉZ GOMÉZ- HUMARÁN

Suplente



Centro Universitario, septiembre 27, 2019.
Oficio Núm.: 3811

C. García Maldonado Osiris Lizbeth
Exp.: 272807
Facultad de Ciencias Naturales Presente.

Para los efectos académicos que tengan lugar, me permito hacer de su conocimiento que el H. Consejo Universitario, reunido en su Sesión Ordinaria del 26 de septiembre de 2019, con apoyo en el dictamen emitido por el H. Consejo de Investigación y Posgrado, tuvo a bien autorizar que sustente su Examen para que pueda obtener el grado de **Maestría en Salud y Producción Animal Sustentable**.

Por la opción de: Presentación de Tesis y Examen de Grado.

Atentamente
"Educo en la Verdad y en el Honor"

Dr. Aurelio Domínguez González
Secretario del H. Consejo Universitario

Cc Facultad de Ciencias Naturales
Dirección de Investigación y Posgrado
Dirección de Servicios Académicos
Archivo

ADG/rfo



Dedicada a:

Mis padres Gregorio García Vásquez y Graciela Maldonado, sabiendo que no existirá una forma de agradecer toda una vida de sacrificios y esfuerzos, quiero que sepan que el objetivo logrado también es suyo y que la fuerza que me ayudó a conseguirlo fue su apoyo.

A mi hermana Mercedes por su amor incondicional y por procurar siempre mi bienestar.

A mi hermano Iván por su carisma y sus palabras de aliento que motivan mi superación.

A mi hermana Dulce por el entusiasmo demostrado en los momentos difíciles.

A Ian y Uriel por llenar de alegría mi hogar con toda su inocencia.

A Ivonne y Polo por su amor y enseñarme sobre la confianza y amistad verdaderas.

A Sarita por los todos los momentos agradables, por su amistad y apoyo en todo momento.

A Alan por su amor, cariño, comprensión, perseverancia, por las noches en vela acompañándome a escribir, por ayudarme a despertar todas las mañanas, por ser mi compañero en todo momento.

Con todo mi amor, Osiris

AGRADECIMIENTOS:

A los integrantes de mi comité tutorial por su apoyo, confianza y conocimientos brindados para la elaboración de esta tesis, Dr. Feliciano Milián Suazo, Dr. Germinal Jorge Cantó Alarcón, M. en C. Beatriz Liliana Álvarez Mayorga, M. en C. Susana Lucía Sosa Gallegos y Dra. María Concepción Méndez Gómez Humarán.

Al Dr. Efrén Días Aparicio del CENID-Microbiología, INIFAP por su colaboración en los cultivos de *Brucella abortus*.

Al M. en C. Marco Antonio Santillán Flores del laboratorio de tuberculosis bovina del CENID Microbiología INIFAP, por su colaboración con el cultivo de *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*.

Al Dr. Manuel Campos Quiñones de SCCL por el financiamiento parcial de este trabajo de tesis a través de **IMMUNAXIS INC.**

A la Dra. Araceli Aguilera Barreiro coordinadora de la Maestría en Salud y Producción Animal Sustentable por su invaluable trabajo y apoyo.

A la Dra. Sara González Ruiz por su apoyo en la realización de este trabajo.

Un agradecimiento a todos mis compañeros de posgrado quienes colaboraron con mi aprendizaje en diversos momentos.

El presente trabajo se desarrolló en el laboratorio de Microbiología Veterinaria (Facultad de Ciencias Naturales) y el laboratorio de Microbiología de Alimentos (Facultad de Química) de la Universidad Autónoma de Querétaro, bajo la dirección del Dr. Feliciano Milián Suazo, con el apoyo financiero de INMUNAXIS y la Universidad Autónoma de Querétaro.

Dirección General de Bibliotecas UAQ

Contenido

I. INTRODUCCIÓN.....	1
II. ANTECEDENTES.....	2
2.1 Calostro bovino	2
2.1.1 Calidad del calostro bovino.....	3
2.1.2 Calidad bacteriológica del calostro.....	4
2.1.3 El calostro como inmunoregulador	5
2.2 Tratamiento térmico del calostro bovino.....	6
2.2.1 Tipos de tratamiento térmico del calostro	6
2.3. Suministro de calostro a terneras.....	9
2.4 Patógenos presentes en el calostro	10
2.4.1 <i>Salmonella spp.</i>	11
2.4.1.1 Determinación microbiológica de <i>Salmonella</i>	12
2.4.1.2 Diagnóstico molecular de <i>Salmonella</i>	13
2.4.2 <i>Brucella abortus</i>	13
2.4.3 <i>Staphylococcus aureus</i>	14
2.4.3.1 Determinación microbiológica de <i>Staphylococcus aureus</i>	15
2.4.4 <i>Listeria monocytogenes</i>	17
2.4.5 <i>Mycobacterium bovis</i>	17
2.4.6 <i>Mycobacterium avium</i> subsp. paratuberculosis (MAP)	19
III. HIPÓTESIS	20
4.1 Hipótesis	20
IV. OBJETIVOS.....	20
4.2 Objetivo General:	20
4.2.1 Objetivos específicos:.....	20
V. MATERIALES Y MÉTODOS.....	21
5.1 Muestreo	21
5.2 Determinación microbiológica	21
5.2.1 Determinación microbiológica empleando placas de detección rápida <i>Compact Dry</i>	21
5.2.1.1 Determinación de Coliformes totales y <i>Escherichia coli</i>	21
5.2.1.2 Determinación de la presencia de <i>Salmonella spp.</i>	22
5.2.1.3 Determinación de <i>Staphylococcus</i> y <i>Listeria spp.</i>	22
5.2.2 Determinación microbiológica por método tradicional.	23
5.2.2.1 Cuantificación de coliformes totales.....	23
5.2.2.2 Cuantificación de <i>Escherichia coli</i> por la técnica del número más probable (NMP)	23
5.2.2.3 Determinación de presencia de <i>Salmonella spp.</i>	24
5.2.2.4 Determinación de <i>Brucella abortus</i>	24
5.2.2.5 Determinación de <i>Staphylococcus aureus</i>	25
5.2.2.6 Determinación de la presencia de <i>Listeria monocytogenes</i>	25
5.2.2.7 Determinación de presencia de <i>Mycobacterium bovis</i>	25
5.2.2.8 Determinación de <i>Mycobacterium avium</i> , subespecie paratuberculosis (MAP).	26

5.3 Determinación del tiempo de reducción decimal (valor D) de <i>Salmonella entérica</i> y <i>Staphylococcus aureus</i> en calostro bovino.	27
VI RESULTADOS Y DISCUSIÓN	28
6.1 Resultados de la determinación de la presencia de microorganismos empleando placas <i>Compact Dry</i>	28
6.1.1 Microorganismos indicadores (<i>Coliformes</i> y <i>E. coli</i>).....	28
6.1.2 Determinación de la presencia de microorganismos patógenos (<i>Salmonella spp.</i> , <i>Staphylococcus spp.</i> y <i>Listeria spp.</i>).....	30
6.2 Resultados de los cultivos microbiológicos empleando métodos tradicionales.	33
6.2.1 Microorganismos indicadores.....	33
6.2.2 Microorganismos patógenos.	36
6.2.2.1 <i>Salmonella spp.</i>	36
6.2.2.2 <i>Brucella abortus</i>	36
6.2.2.3 <i>Staphylococcus aureus</i>	37
6.2.2.4 <i>Listeria monocytogenes</i>	37
6.2.2.5 <i>Mycobacterium bovis</i>	38
6.2.2.6 <i>Mycobacterium avium</i> subesp. Paratuberculosis.	38
6.3 Determinación del valor D de <i>Salmonella enterica</i> y <i>Staphylococcus aureus</i> en calostro bovino.	38
VII CONCLUSIONES	41
VIII BIBLIOGRAFIA	42
IX ANEXOS	47
9.1 Metodología empleada para el cultivo de <i>M. bovis</i> en calostro bovino.....	47
9.2 Metodología modificada para el cultivo de <i>M. bovis</i> en calostro bovino.....	48
9.3 Metodología empleada en la extracción de DNA de calostro.....	50
9.4 Consideraciones para el uso de sistemas comerciales de pasterización.....	51
9.5 Procedimiento adecuado de limpieza de los equipos:	51
9.6 Resultados del cultivo de <i>Mycobacterium avium</i>	52
9.7 Resultados del cultivo de <i>Brucella abortus</i>	54

INDICE DE CUADROS Y FIGURAS:

Cuadro	Descripción	Página
1	Composición del calostro, leche en transición y leche normal de vaca	3
2	Resultado del análisis de muestras de calostro pre y post tratamiento térmico utilizando placas Compact Dry. Muestras positivas a Coliformes Totales, <i>E.coli</i> , <i>Salmonella spp.</i> , <i>Staphylococcus spp.</i> y <i>Listeria spp.</i>	32
3	Proporción de unidades de producción con posible presencia de microorganismos indicadores y patógenos antes y después del tratamiento térmico.	32
4	Muestras de calostro positivas y negativas al cultivo en agar de bilis y rojo violeta.	35

Figura	Descripción	Página
1	Morfología característica de <i>E. coli</i> en placas Compact Dry EC.	28
2	Morfología característica de Coliformes totales en placas Compact Dry EC.	29
3	Morfología característica de <i>Staphylococcus spp.</i> en placas Compact Dry X-SA.	30
4	Morfología característica de <i>Listeria spp.</i> en placas Compact Dry LS.	31
5	Recuento de Coliformes totales (UFC/mL- Log10) antes y después del tratamiento térmico, en 18 unidades de producción que emplean equipos DairyTech.	34
6	Resultados obtenidos por Godden en 2012 en el análisis de calostro fresco y calostro tratado térmicamente.	36
7	Resultados obtenidos por Godden en 2012 donde se demuestra el efecto del tratamiento térmico del calostro sobre el riesgo de morbilidad y mortalidad en terneros.	36
8	Recuento de UFC en agar Baird Parker a partir de calostros de unidades de producción que emplean equipos DairyTech.	37
9	Valor D de <i>Salmonella sp.</i> en muestras de calostro sometido a tratamiento térmico (nivel laboratorio) a 60°C durante 60 minutos empleando un Pool de <i>Salmonella</i> resistente a rifampicina.	39
10	Valores D de <i>Staphylococcus aureus</i> en muestras de calostro sometido a tratamiento térmico (nivel laboratorio) a 60°C durante 60 minutos empleando una cepa resistente a rifampicina.	40

LISTA DE ABREVIATURAS

Aw	Actividad de agua
UFC	Unidades Formadoras de Colonias
Ig	Dominios de inmunoglobulina
IL	Interleucina
OMS	Organización Mundial de la Salud
IgE	Inmunoglobulina E
AP	Agua Peptonada
DP	Diluyente de Peptona
VB	Agar Verde Brillante
CTT	Caldo tetrionato
XLD	Agar Xilosa-Lisina-Desoxicolato
ABRV	Agar de Bilis y Rojo Violeta
BHI	Infusión cerebro corazón
TSI	Agar Hierro- triple azúcar
LIA	Agar Hierro-Lisina
RPVS	Rappaport-Vasiliadis
SC	Selenito Cistina
ABS	Agar Sulfito Bismuto
MAP	<i>Mycobacterium avium</i> subesp. paratuberculosis
COFEPRIS	Comisión Federal para la protección contra Riesgos Sanitarios
SEMARNAT	Secretaría del Medio Ambiente y Recursos Naturales
SAGARPA	Secretaria de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación

RESUMEN:

En el presente trabajo se evaluó la presencia de organismos patógenos en el calostro antes y después del tratamiento térmico en unidades de producción lechera con la finalidad de determinar si el tratamiento del calostro es el adecuado para garantizar que los agentes patógenos presentes en la madre y el ambiente no son transmitidos al neonato. Para dicha determinación se analizaron 22 unidades de producción lechera pertenecientes a la región de la Comarca Lagunera donde se cuenta con un sistema de tratamiento térmico por lotes de forma estándar con un tiempo de tratamiento de 60 minutos a una temperatura de 60°C.

Los microorganismos buscados en las muestras de calostro fueron *Coliformes totales* (Indicador de contaminación ambiental), *Escherichia coli* (Indicador de contaminación fecal), *Listeria spp.* (Indicador de eficiencia de tratamiento térmico), *Staphylococcus spp.*, *Micobacterium avium* subesp. *paratuberculosis* y *Brucella abortus*. Para la determinación y cuantificación de cada uno de los microorganismos planteados de desarrollaron 2 metodologías, la primera de detección rápida (Compact Dry) y la segunda por métodos tradicionales.

Después del análisis de resultados se observó que en algunas unidades de producción el manejo del calostro después del tratamiento térmico es deficiente, dada la presencia de Coliformes totales, que teóricamente son eliminados con tratamientos por encima de los 45°C; sin embargo, a pesar de que los “pasteurizadores” en los establos utilizan condiciones óptimas de operación en los equipos DairyTech, estos microorganismos persisten o son incorporados por malas prácticas de manejo del calostro post-tratamiento térmico. Todas las muestras analizadas fueron negativas a los microorganismos patógenos, *E. coli*, *Salmonella*, *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes* y *Brucella abortus*.

Palabras clave: Calostro, tratamiento térmico, calidad sanitaria.

ABSTRACT:

In the present work, the presence of pathogenic organisms in colostrum is evaluated before and after heat treatment in dairy production units in order to determine if the treatment of colostrum is adequate to ensure that the pathogens present in the mother and the mother The environment is not transmitted to the newborn for which 22 dairy production units belonging to the region of the Lagunera Region were analyzed, where there is a standard batch heat treatment system with a treatment time of 60 minutes at a temperature of 60 ° C

The microorganisms sought in colostrum samples were Total coliforms (Indicator of environmental contamination), *Escherichia coli* (Indicator of faecal contamination), *Listeria* spp. (Heat treatment efficiency indicator), *Staphylococcus* spp., *Micobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* and *Brucella abortus*. For the determination and quantification of each one of the raised microorganisms of 2 methodologies developed, the first one of rapid detection (Compact Dry) and the second one by traditional methods.

After the analysis of the results, it was observed that in some production units the management of colostrum after heat treatment is poor, given the presence of total Coliforms, which are theoretically eliminated with treatments above 45 ° C; However, although the “pasteurizers” in the stables use optimal operating conditions in DairyTech equipment, these microorganisms persist or are incorporated by bad management practices of colostrum after heat treatment. All samples analyzed were negative for pathogenic microorganisms, *E. coli*, *Salmonella*, *Stsphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes* and *Brucella abortus*.

Keywords: Colostrum, heat treatment, sanitary quality.

I. INTRODUCCIÓN

Los bovinos nacen carentes de protección inmune, por ello, los primeros días después del nacimiento son de vital importancia para el desarrollo de su sistema inmune, éste a su vez depende totalmente de la absorción de los IgGs maternos contenidos en el calostro (Pandey *et al.*, 2011; Fischer, 2017). El calostro debe poseer alta calidad para poder conferir salud al neonato, por lo que es necesario realizar tratamientos a los calostros previos a ser suministrados a los terneros esto con la finalidad de eliminar agentes biológicos que interfieren con su salud, los tratamientos previos consisten en calentamiento a temperaturas elevadas de tal forma que pueda eliminarse la mayor cantidad de agentes patógenos presentes sin desintegrar a las inmunoglobulinas (McGrath *et al.*, 2016; Elizondo-Salazar *et al.*, 2010.)

A partir de los experimentos realizados por Romero y Álvarez (2015), se determinó que utilizar un proceso térmico no es igual a la esterilización, debido a que, si se tiene un calostro con alta presencia de microorganismos y bacterias, el tratamiento térmico puede no eliminarlas por completo. El problema radica en que los terneros recién nacidos son sensibles a diarreas neonatales en los primeros días después del nacimiento y la actividad del sistema inmunitario empieza a activarse a partir del día 14 después del nacimiento. Es importante considerar que las diarreas y enfermedades en un hato lechero pueden causar tasas de mortalidad entre un 5 y 50%, provocando grandes pérdidas económicas (Romero y Álvarez, 2015).

Por lo anterior, en el presente trabajo se evaluó la presencia de organismos patógenos en el calostro antes y después del tratamiento térmico en unidades de producción lechera con la finalidad de determinar si el tratamiento del calostro es el adecuado para garantizar que los agentes patógenos presentes en la madre y el ambiente no son transmitidos al neonato.

II. ANTECEDENTES

2.1 Calostro bovino

El calostro es la leche "temprana" producida por el mamífero en los primeros días después del parto. En bovinos la producción del calostro ocurre en los primeros 4 días, y el papel de este en un recién nacido no es de solo proporcionar nutrición, sino también protección contra infecciones mientras el sistema inmunológico del becerro se desarrolla (Pandey *et al.*, 2011).

La ingesta de calostro influye en el metabolismo, los sistemas endocrinos y el estado nutricional; además, estimula el desarrollo y la función del tracto gastrointestinal (McGrath *et al.*, 2016). La composición y propiedades físicas del calostro son muy variables debido al número de factores que influyen en su producción. Estos factores incluyen la individualidad, la raza, la paridad, la nutrición preparto, el período seco de las vacas y el tiempo posterior al parto. De forma general el calostro tiene un perfil nutricional y composición inmunológica distinta de la leche "madura", está compuesto de proteínas, carbohidratos, grasas, vitaminas y minerales (Figura 1). En el perfil nutricional se incluyen factores de crecimiento, citosinas, nucleósidos, factores antimicrobianos naturales, factores de regulación inmune y factores antioxidantes (McGrath *et al.*, 2016).

El calostro representa aproximadamente el 0.5% de la producción anual de leche de una vaca. La mayoría de las vacas lecheras saludables producen calostro muy por encima de los requerimientos de la ternera, pero típicamente la leche recolectada durante el calostro se considera no comercializable y a menudo se excluye de la recolección de leche a granel.

El alto contenido proteico del calostro conduce a múltiples problemas en los procesos industriales, por ejemplo, la baja estabilidad térmica, que interfiere con la pasteurización (McGrath *et al.*, 2016).

Cuadro 1. Composición del calostro, leche en transición y leche normal de la vaca.
Botero (2013)

Variable	1 Calostro	2 Transición	3 Leche	Leche
Gravedad específica	1.056	1.04	1.035	1.032
Sólidos totales (%)	23.9	17.9	14.1	12.5
Grasa (%)	6.7	5.4	3.9	3.6
Sólidos no grasos (%)	16.7	12.2	9.8	8.6
Proteína total (%)	14.0	8.4	5.1	3.2
Caseína (%)	4.8	4.3	3.8	2.5
Albúmina (%)	0.9	1.1	0.9	0.5
Inmunoglobulinas (%)	6	4.2	2.4	0.09
IgG (%)	3.2	2.5	1.5	0.06
Nitrógeno no proteico (%)	8.0	7.0	8.3	4.9
Lactosa (%)	2.7	3.9	4.4	4.9
Calcio (%)	0.26	0.15	0.15	0.13
Magnesio (%)	1.04	0.01	0.01	1.01
Potasio (%)	0.14	0.13	0.14	0.15
Sodio (%)	0.14	0.13	0.14	0.15
Cloruro (%)	0.12	0.10	0.10	0.07
Hierro (mg/100 mL)	0.20	-	-	0.05
Cobre (mg/100 mL)	0.06	-	-	0.01
Vitamina A (µg/100 mL)	295	190	113	34
Vitamina E (µg/g grasa)	84	76	56	15
Carotenos (µg/g grasa)	103.3	-	-	11.3
Riboflavina (µg/mL)	4.83	2.71	1.85	1.47
Ácido pantoténico (µg/mL)	1.73	-	3.20	3.82
Vitamina B12 (µg/100 mL)	4.9	-	2.5	0.06
Ácido fólico (µg/100 mL)	0.8	-	0.2	0.02
Colina (mg/mL)	0.70	0.34	0.23	0.13
Ácido ascórbico (mg/100 mL)	2.5	-	2.23	2.2

2.1.1 Calidad del calostro bovino

Los neonatos requieren de asistencia inmune pasiva a través de anticuerpos y linfocitos no específicos que actúan contra la mayoría de microorganismos de su entorno transferidos por la madre a través del calostro hasta que el ternero desarrolla su inmunidad activa. Las inmunoglobulinas son componentes del sistema inmunológico cuya función es neutralizar y ayudar a destruir bacterias, así como

otras partículas extrañas que hayan invadido el cuerpo del recién nacido al momento del parto. La calidad del calostro en términos de anticuerpos producidos por una vaca puede ser determinada por medio de la regresión $Y=254.716X-261.451$ (donde Y es la concentración de Ig en %, y X es la gravedad específica del calostro (Fortín and Perdomo, 2009; Elizondo-Salazar *et al.*, 2010).

2.1.2 Calidad bacteriológica del calostro

Con base en los parámetros descritos por Botero (2013), se considera un calostro de buena calidad bacteriológica si la cuenta total de bacterias es menor a 100,000 UFC/ml, y la cuenta total de Coliformes es menor a 10,000 UFC/ml.

La calidad bacteriológica del calostro tiene varios puntos críticos que lo afectan. En primer lugar, está la calidad bacteriológica proveniente de la ubre y de la limpieza de la piel. Segundo esta la condición higiénica del equipo de ordeño. En tercer lugar, están los utensilios que se usan para colectar y, por último, están los utensilios para almacenar o alimentar. En general, el calostro es transferido de recipiente muchas veces, en promedio 2.5 veces, lo que aumenta el riesgo de contaminación. El 42 % de los calostros de las lecherías son transferidos 3 veces antes de ser utilizado para alimentación. El calostro es dejado frecuentemente al medio ambiente por períodos largos, aumentando el riesgo de crecimiento bacteriano; 54% de los calostros de las lecherías investigadas permanecieron a temperatura ambiente más de 60 minutos.

También es frecuente encontrar calostro que ha sido refrigerado por mucho tiempo (>48 horas). El resultado es un calostro con conteos bacterianos 10 veces mayores que el calostro fresco. El calostro con conteos bacterianos altos puede tener varios problemas, primero, las bacterias pueden interferir con la absorción de Inmunoglobulinas (por bloqueo de receptores, porque se pegan a la bacteria y salen con la materia fecal o porque las toxinas pueden destruir células que absorben las inmunoglobulinas), y segundo, las bacterias u otro tipo de microorganismos pueden

ser patógenos y afectar la salud del ternero/a, aunado a esto, los patógenos al ser pasados de generación en generación permanecen endémicos en el hato.

En un estudio en paralelo, el conteo total de bacterias en muestras de calostros de lecherías de Minnesota, el promedio fue de 615 millones de UFC/ml; 93% de las muestras tuvo resultados >100,000 UFC/ml. En otra investigación llevada en lecherías de Wisconsin, el 82 % de las muestras de calostro tuvo conteos >100,00 UFC/ml (Botero, 2013).

2.1.3 El calostro como inmunoregulador

En bovinos las inmunoglobulinas son transferidas a través del calostro, este contiene a las inmunoglobulinas IgG, IgM, IgA, IgD e IgE. El calostro contiene de 70-80% de IgG, 10-15% de IgM y 10-15% de IgA (Fischer, 2017). La mayoría de las IgGs en el calostro bovino proviene de la sangre. Cuando las inmunoglobulinas se ingieren por vía oral no son absorbidas por el torrente sanguíneo en animales de 36 a 48h de edad; sin embargo, las inmunoglobulinas dentro del tracto gastrointestinal son eficaces contra organismos patógenos en bovinos de todas las edades. Las inmunoglobulinas calostrales son capaces de aglutinar organismos invasores tales como bacterias, virus, hongos y parásitos que entran en el tracto intestinal, facilitando su extirpación antes de causar infección y enfermedad (Pandey *et al.*, 2011; Fortín and Perdomo, 2009).

Por otra parte, las citoquinas IL-1, IL-2, IL-6, TNF e IFN, presentes en el calostro, son componentes fundamentales del sistema inmune debido a que mejoran la maduración de las células B y T, e incrementan el nivel de producción de anticuerpos endógenos. Las citoquinas juegan un papel importante en la regulación del crecimiento de células epiteliales, incluyendo inflamación intestinal y restitución epitelial después del daño a la mucosa (Stelwagen *et al.*, 2009).

2.2 Tratamiento térmico del calostro bovino

La calidad del calostro puede mejorarse después del parto sometiéndolo a un tratamiento térmico semejante a la pasteurización. Este tratamiento incrementa su calidad disminuyendo la carga bacteriana, sin embargo, utilizando condiciones predeterminadas de tiempo y temperatura reducen la concentración nativa de inmunoglobulinas y aumenta la viscosidad (McGrath *et al.*, 2016; Elizondo-Salazar *et al.*, 2010).

La adopción de sistemas de pasteurización en unidades de producción ha reportado resultados significativos en la salud de las terneras y en los ingresos económicos del productor, pero la principal pregunta que surge sobre la conveniencia de la pasteurización de calostro es con respecto a si la pasteurización causa degradación de las inmunoglobulinas presentes en el calostro. Elizondo-Salazar (2008) determinó experimentalmente que el tratamiento térmico del calostro puede reducir significativamente la carga bacteriana, obteniendo el beneficio de reducir la enteritis causada por coliformes fecales, lo mismo que previene la transmisión de otros patógenos económicamente importantes como *Salmonella* y *Mycoplasma* spp.

De forma no concluyente, y aportando a la hipótesis de que bacterias vivas en el calostro pueden interferir con la absorción pasiva de los anticuerpos en el calostro, Elizondo-Salazar (2009) determinó que proveer calostro tratado térmicamente puede ayudar a incrementar la transferencia de IgG en terneras recién nacidas.

2.2.1 Tipos de tratamiento térmico del calostro

De acuerdo con la clasificación de equipos distribuidos por *Dairy Tech* existen dos métodos comunes de pasteurización de la leche: pasteurización discontinua y pasteurización de flujo continuo a alta temperatura y corta duración (HTST).

La pasteurización por lotes estándar se lleva a cabo cuando un lote de leche se calienta a 63 °C durante 30 minutos. Después de este tiempo la leche se enfría y se puede alimentar a las terneras. Los pasteurizadores por lotes deben estar equipados con un agitador para permitir un calentamiento uniforme. Los lotes son seleccionados del tamaño adecuado para garantizar que la elevación de la temperatura se de en tiempos cortos para de esta manera disminuir la probabilidad de que algunas bacterias se vuelvan resistentes al calor y sobrevivan al proceso de pasteurización. El proceso de limpieza de estas unidades se realiza a menudo manualmente (Dairy Tech Inc., 2018).

El proceso de HTST consiste en hace circular la leche a través de una red de serpentines calentados, la leche es calentada rápidamente a 72 °C y se mantiene a esta temperatura por 15 segundos. Este tipo de sistema está equipado para enfriar de forma automática la leche a la temperatura de alimentación o almacenamiento. Los sistemas de flujo continuo generalmente son más difíciles de limpiar debido a que requieren un procedimiento de limpieza similar al que se usa en los sistemas de ordeño (Dairy Tech Inc., 2018).

Con base a la información obtenida por McGrath *et al.* (2016), se sabe que el calentamiento del calostro a 60 °C durante 120 minutos es suficiente para reducir el nivel de *Mycoplasma bovis* viable, *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella enteritidis* y *Mycobacterium avium* subespecie *paratuberculosis*, por debajo de los límites detectables. También se describe que calentar el calostro a 60 °C durante 60 minutos disminuye el recuento de bacterias mesófilas aerobias y coliformes, sin afectar la concentración de IgG nativa.

En una investigación Stabel (2001) demostró que el tratamiento térmico a 65.5 °C durante 30 minutos es adecuado para lograr la destrucción total de *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. Butler *et al.* (2000) demostraron que

la pasteurización en el campo de la leche residual a 65 °C durante 10 minutos tiene la capacidad de destruir la corteza de las micobacterias como *Mycoplasma bovis*, *M. californicum* y *M. canadense*. En este estudio también se determinó que *M. bovis* y *M. californicum* no crecen después del tratamiento a 60 °C durante 5 y 10 minutos respectivamente, mientras que *M. canadense* permaneció viable después de 30 minutos de calor.

M. bovis y *M. californicum* fueron negativas por cultivo después del tratamiento por 2 minutos a 65 °C, pero *M. canadense* produjo colonias cuando se procesó a 65 °C durante 10 min. Cuando la temperatura aumentó a 67.5 °C por 1 minuto, se inactivó a *M. bovis*, por 2 minutos a *M. californicum* y por 5 minutos a *M. canadense*. En otro estudio, [Stabel et al. \(2004\)](#), demostraron que la pasteurización HTST es efectiva en la destrucción de *M. paratuberculosis*, algunos serovares de *Salmonella* y algunas especies de *Mycoplasma* en la leche de desecho.

Una forma de determinar la eficiencia del tratamiento térmico es llevar a cabo la determinación del tiempo de reducción decimal (valor D) de un microorganismo en específico dentro de la matriz alimenticia de interés, el valor D de un microorganismo se define como el tiempo necesario para que a una temperatura determinada se reduzca el 90% de su población en el material tratado. El valor D es una expresión de la resistencia del microorganismo al efecto de la temperatura y puede calcularse mediante la fórmula de Stumbo: $D_n = t / (\log_a - \log_b)$, donde n=temperatura del proceso, t= tiempo durante el cual se aplica esa temperatura, a=numero inicial de microorganismos y b= numero final de microorganismos.

Los equipos *Dairy Tech* de pasteurización DT10G, DT30G y DT60G, junto con el equipo *MilkWorks Gold* están diseñados para pasteurizar calostro y leche. También vienen con la opción para enfriar el calostro rápidamente, impidiendo el crecimiento bacteriano. Los equipos *Milkworks* vienen con la opción para enfriar más rápidamente el calostro y se puede ajustar la temperatura objetivo, de manera que queden listos para refrigerar o congelar ([Botero, 2013](#)).

Basados en los múltiples experimentos realizados para definir la eficacia del tratamiento térmico se ha demostrado que la proporción de IgG en el calostro no se

ve afectada por el tratamiento térmico; sin embargo, [Tacoma et al. \(2017\)](#) ha iniciado una serie de estudios enfocados a la absorción de citoquinas asociadas a calostro tratado térmicamente. En su estudio alimentó a un grupo de animales con calostro tratado térmicamente y a otro grupo de animales los alimentó con calostro no tratado, y observó una reducción significativa en la absorción de citoquinas en los terneros que recibieron calostro tratado térmicamente, lo que implica que el tratamiento puede afectar el funcionamiento y la absorción en el desarrollo del neonato.

2.3. Suministro de calostro a terneras

Durante mucho tiempo se ha reconocido que, para asegurar una adecuada transferencia de inmunidad pasiva en terneras, es necesaria la administración de una cantidad y calidad correcta de calostro bovino en las primeras horas de vida; sin embargo, recientemente se ha sugerido que la contaminación bacteriana juega un papel importante ([González, 2015](#)).

De acuerdo con [Romero y Álvarez \(2015\)](#) existen 3 factores de suma importancia en el suministro del calostro al ternero, que son: calidad, cantidad y tiempo de suministro, que influyen en la salud y la productividad. Estos autores mencionan que el suministro de calostro debe ser en las primeras 6 horas de vida del ternero, de forma ideal en las primeras 3, es importante además de esto suministrar una cantidad de 10-12% del peso del animal al nacimiento para asegurar un buen desempeño productivo en el futuro del animal.

La morbilidad en unidades de producción se encuentra relacionada con la deficiencia en el suministro del calostro al nacer, en consecuencia, la utilización de medicamentos para mejora de los terneros eleva los costos de producción, por lo tanto, todas las medidas empleadas para mejorar el suministro y calidad del calostro permitirán disminuir tasas de mortalidad y optimizar los resultados en crecimiento y producción ([Romero y Álvarez, 2015](#)).

En diversas unidades de producción lechera, los terneros recién nacidos son alimentados a mano, una desventaja de este método de alimentación es el riesgo elevado de contaminación bacteriana antes de la alimentación y posterior al tratamiento térmico (Tacoma *et al.*, 2017).

A partir de los experimentos realizados por Romero y Álvarez (2015), se determinó que utilizar un proceso térmico no es igual a la esterilización, debido a que, si se tiene un calostro con alta presencia de microorganismos y bacterias, el tratamiento térmico puede no eliminarlas por completo. El problema radica en que los terneros recién nacidos son sensibles a diarreas neonatales en los primeros días después del nacimiento y la actividad del sistema inmunitario empieza a activarse a partir del día 14 después del nacimiento. Es importante considerar que las diarreas y las enfermedades en un hato lechero pueden causar tasas de mortalidad entre 5 y 50%, provocando grandes pérdidas económicas (Romero y Álvarez, 2015).

El calostro puede ser refrigerado a 4°C por una semana sin que pierda su calidad. Por su parte, el calostro en exceso se puede congelar y almacenar hasta por un año sin que pierda actividad o disminuya el contenido de IgG. El calostro almacenado, cuando se va a suministrar a las terneras se puede descongelar en agua tibia (45-50°C) con el cuidado de no sobrecalentarlo, ya que esto podría degradar las IgGs y otras proteínas, dando como resultado un calostro de baja calidad (Elizondo-Salazar, 2007).

2.4 Patógenos presentes en el calostro

Los factores inmunológicos presentes en el calostro son de gran importancia para el desarrollo adecuado de los neonatos, sin embargo, por medio del calostro no solo se transmiten moléculas benéficas, también es posible la transmisión de microorganismos patógenos que opacan sus beneficios. Los patógenos presentes en el calostro pueden venir de la glándula mamaria o del medio ambiente por el manejo inadecuado en los establos.

Los puntos de control para obtener un calostro con una baja carga bacteriana son: prevenir la contaminación durante el ordeño, el almacenamiento y el proceso de los alimentos; además de una serie de estrategias para prevenir la proliferación de bacterias en el calostro, como son: almacenado en refrigeración, el congelamiento y el uso de agentes preservantes como el sorbato de potasio en calostro fresco. Un método adicional para reducir o eliminar los patógenos bacterianos y cuyo uso se está incrementando, es el tratamiento térmico del calostro fresco.

Salmonella spp., *Escherichia coli*, *Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis* (MAP), *Mycoplasma spp.*, el virus de la leucemia bovina *Campylobacter spp.*, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus* son sólo algunos de los patógenos que pueden aislarse del calostro. Algunos estudios han determinado que altas concentraciones de bacterias en el calostro pueden estar asociadas con la disminución de la absorción de IgG (Godden *et al.*, 2006; Stewart *et al.*, 2005; Kryzer *et al.*, 2015; Saalfeld *et al.*, 2016).

2.4.1 *Salmonella spp.*

El género *Salmonella* pertenece a la familia de las *Enterobacteriaceae*. Está integrada por bacilos Gram negativos, anaerobios facultativos no esporulados, generalmente móviles por flagelos peritricos que utilizan citrato como única fuente de carbono, y poseen metabolismo de tipo oxidativo y fermentativo. Para su crecimiento no requieren cloruro de sodio, pero pueden crecer en concentraciones que van desde 0.4% al 4%. La mayoría de los serotipos de *Salmonella* crecen en un rango de temperatura que va desde 5 °C a 47 °C, con una temperatura óptima de 35°C-37°C, algunas cepas pueden llegar a crecer desde 2°C y hasta 54°C. El pH de crecimiento oscila entre 4-9, con un óptimo de entre 6.5 y 7.5. Se desarrollan bien a una actividad de agua (A_w) de 0.99 a 0.94, pueden llegar a sobrevivir en alimentos secos con $A_w < 0.2$. Su crecimiento se inhibe completamente a

temperaturas inferiores a 7°C, pH <3.8 y una Aw <0.94. Se caracterizan por ser de amplia distribución, altamente patógenos y de difícil aislamiento, con más de 2,500 serotipos identificados, donde *Salmonella enterica* serovar Typhimurium, Enteritidis y Newport son los serotipos más aislados en alimentos a nivel mundial (Gonzalez Pedraza et al., 2013; Parra et al., 2002).

La infección por *Salmonella* en los animales se desarrolla de la misma forma que en el hombre, su transmisión es fecal-oral y ocasiona gastroenteritis y septicemia mortal particularmente en animales jóvenes. Las principales cepas que generan salmonelosis clínica en bovinos son las serovariedades Dublin, Typhimurium y Enteritidis. En terneros cuando se presenta la septicemia puede observarse enteritis, poliartritis y neumonía, acompañada de fiebre e inapetencia (Rivera et al., 2012). Los métodos microbiológicos tradicionales para la detección de *Salmonella* no van encaminados al conteo de esta bacteria, se considera una técnica cuyo resultado se expresa cualitativamente, determinando su presencia o ausencia en diferentes matrices.

2.4.1.1 Determinación microbiológica de *Salmonella*

Los métodos microbiológicos tradicionales para la detección de *Salmonella*, no van encaminados al conteo de esta bacteria, se considera una técnica cuyo resultado se expresa cualitativamente, determinando su presencia o ausencia en diferentes matrices. La detección está basada en el empleo de medios de cultivo selectivos y posterior caracterización de las colonias mediante pruebas bioquímicas y serológicas: El aislamiento e identificación de *Salmonella* en una muestra requiere de tres etapas:

Etapas de pre-enriquecimiento: El objetivo de esta etapa es normalizar metabólicamente las células de *Salmonella spp.* que se encuentren en determinada matriz para su perfecto desarrollo, y todos los microorganismos compiten por los nutrientes. Se realiza a partir de medios de cultivo no selectivos como agua

peptonada, caldo nutritivo, caldo lactosado o agua destilada estéril adicionada con solución de verde brillante al 0.1% en el caso de leche en polvo. Es necesaria una incubación a 37°C durante 18 a 24 horas.

Etapa de enriquecimiento selectivo. Esta etapa estimula y favorece el crecimiento de *Salmonella spp.*, inhibiendo el crecimiento de la flora acompañante; los medios de cultivo utilizados son: Caldo Tetrionato-Bilis-Verde Brillante según Mueller-Kauffmann, Caldo Rappaport-Vasiliadis (RPVS) y Selenito Cistina (SC).

Etapa de aislamiento en medios selectivos. Esta etapa permite la diferenciación de colonias de *Salmonella* de otras bacterias. Esta diferenciación radica en la composición de los distintos medios que permiten el crecimiento de las colonias con aspectos característicos. Para aislar y diferenciar las colonias de *Salmonella*, los medios de cultivo contienen sustancias inhibitorias tales como: antibióticos, sales biliares, desoxicolato, verde brillante y bismuto de sulfito; los medios más empleados son: agar Entérico Hektoen. (EH), agar Xilosa, Lisina, Desoxicolato (XLD) y agar Bismuto sulfito (BS) (González, 2013).

2.4.1.2 Diagnóstico molecular de *Salmonella*.

Entre las técnicas moleculares aplicables a la detección de patógenos como *Salmonella spp.* en alimentos, encontramos: reacción en cadena de la polimerasa (PCR), reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (qPCR), pirosecuenciación, amplificación basada en la secuencia del ácido nucleico Hibridación de ADN con sondas y microensayos.

2.4.2 *Brucella abortus*

La brucelosis bovina es causante de grandes pérdidas económicas debido principalmente a *B. abortus*, la cual tiene efectos negativos en el último tercio de la gestación; está implicada en la disminución de la producción de leche, induce al desecho anticipado del hato, provoca el nacimiento de becerras débiles y el nacimiento de becerras aparentemente normales, pero positivas a *Brucella abortus*.

En México la brucelosis esta difundida en todos los estados del país, exceptuando a Sonora, estado que ha sido declarado libre (Carriosa *et al.*, 2013; Mol *et al.*, 2016; Sanogo *et al.*, 2017).

Las vacas infectadas después de un aborto o de un parto eliminan la bacteria, la cual se transmite a otras vacas a través del contacto con placenta, descargas vaginales, fetos y líquidos fetales, por lo que la vaca y sus residuos se convierten en fuentes de infección.

Estudios experimentales han determinado la concentración bacteriana de *B. abortus* en cordones umbilicales en fetos de diferentes vacas positivas a la enfermedad; la concentración oscila entre 10^9 y 10^{13} UFC/g. Estos organismos encontrados en los cordones umbilicales pueden sobrevivir y propagarse por medio de los alimentos y el agua. En condiciones de humedad alta, temperaturas bajas y de baja intensidad solar, la *B. abortus* puede permanecer viable durante meses en el agua, fetos abortados, estiércol, heno, materiales de trabajo y la ropa, pudiendo resistir la desecación en polvo y suelo, especialmente en presencia de material orgánico.

En los bovinos infectados de brucelosis no es frecuente que se presenten signos después del aborto o parto, pero la mayoría de estos animales se convierten en portadores potenciales y continúan eliminando *Brucella* en la leche, calostro y en las descargas uterinas en partos posteriores (Carriosa *et al.*, 2013).

2.4.3 *Staphylococcus aureus*

Dentro de los patógenos contagiosos causantes de mastitis, *Staphylococcus aureus* es el agente etiológico más prevalente, la infección por *S. aureus* comienza con un episodio subclínico o clínico agudo, generalmente evoluciona hacia la cronicidad y puede persistir a lo largo de la vida del animal (Wolter *et al.*, 2002; Pereyra *et al.*, 2014).

El género *Staphylococcus* está formado por cocos Gram positivos, con un diámetro de 0.5 a 1.5 μm , agrupados como células únicas, en pares, tétradas, cadenas cortas o formando racimos. Son bacterias no móviles, no esporuladas, no poseen cápsula, aunque existen algunas cepas que desarrollan una cápsula de limo, y son anaerobias facultativas. La mayoría de los estafilococos producen catalasa (enzima capaz de desdoblar el peróxido de hidrógeno en agua y oxígeno libre); característica que se utiliza para diferenciar el género *Staphylococcus* de los géneros *Streptococcus* y *Enterococcus* que son catalasa negativos.

2.4.3.1 Determinación microbiológica de *Staphylococcus aureus*

En los medios de cultivo tradicionales la mayoría de las especies crecen después de incubarse durante 18-24 horas, formando colonias de 0.5-1.5 mm de diámetro. Las colonias de *S. aureus* se observan lisas, elevadas, brillantes y de bordes enteros, presentan consistencia cremosa y pigmentación que va del amarillo al dorado debido a la producción de carotenoides, la mayoría de las cepas producen β -hemólisis o hemólisis total alrededor de las colonias cuando se cultivan en agar sangre. *S. aureus* se diferencia de las demás especies por producir coagulasa, que se manifiesta por su capacidad para coagular el plasma, es resistente al calor, a la desecación y puede crecer en medios con grandes cantidades de NaCl (7.5 %). *S. aureus* crece bien en medios de cultivos no selectivos, como el agar sangre, agar chocolate, cerebro corazón infusión agar (BHI) y medios líquidos para hemocultivo, donde se recupera fácilmente. Se debe usar un medio selectivo en muestras clínicas donde hay bacterias Gram negativas junto con *S. aureus*.

Un medio parcialmente selectivo que utiliza la capacidad de los estafilococos de reducir el telurito a telurio y detectar la lecitinasa a partir de la lecitina del huevo, es el agar Baird-Parker el cual debido a sus características se utiliza ampliamente en numerosos procedimientos estándar para el análisis de alimentos, cosméticos o agua con el fin de detectar la presencia de *Staphylococcus aureus*.

El agar Baird-Parker contiene las fuentes de carbono y nitrógeno necesarias para el crecimiento. La glicina, el cloruro de litio y el telurito potásico actúan como agentes selectivos. La yema de huevo constituye el sustrato para determinar la producción de lecitinasa y, además la actividad de lipasa. Los estafilococos producen colonias de color de gris oscuro a negro debido a la reducción del telurito; los estafilococos que producen lecitinasa descomponen la yema de huevo y crean zonas transparentes alrededor de las colonias correspondientes. Es posible que se forme una zona de precipitación debido a la actividad de lipasa.

El medio recomendable es el agar sal manitol o medio de Chapman por su elevado contenido de sal que inhibe el crecimiento de la mayoría de las bacterias Gram negativas. Este medio permite realizar la identificación presuntiva de *S. aureus* por la pigmentación amarilla característica de *S. aureus*. Debido a que esta bacteria fermenta el manitol se genera un cambio de color en el medio que vira de rojo pálido a amarillo. Los *Staphylococcus* coagulasa negativos no fermentan el manitol y crecen en el medio formando colonias pequeñas de color que varía de blanco a rosado (Cervantes-García *et al.*, 2014).

Mecanismo de identificación. La identificación de *S. aureus* se realiza con el empleo de la tinción de Gram, pruebas bioquímicas como: prueba de la catalasa, fermentación de glucosa y la prueba de la coagulasa, esta última sigue siendo la más utilizada y se basa en la capacidad de *S. aureus* para producir la enzima extracelular que coagula el plasma. La detección de la coagulasa permite diferenciar *S. aureus* coagulasa positivo de las demás especies de estafilococos coagulasa negativos. Con la prueba de la DNAsa termoestable se identifica fácilmente en el medio que contiene DNA y verde de malaquita. Otras pruebas son específicas de especie, como la fermentación del manitol y la producción de fosfatasa alcalina. *S. aureus* también puede identificarse a través de técnicas moleculares como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y PCR en tiempo real, utilizando genes específicos de especie.

2.4.4 *Listeria monocytogenes*

Es un patógeno alimentario importante que causa Listeriosis en humanos y animales. La presencia de *Listeria spp.* y *L. monocytogenes* en la leche bovina cruda puede conducir a la fabricación de productos contaminados debido a la falta o pasteurización insuficiente. Aunque la bacteria se puede encontrar en la leche cruda, se cree que las fuentes principales de listeria en alimentos son los pescados ahumados o grávidos, los productos cárnicos tratados térmicamente y los quesos blandos y semiblandos, principalmente debido a su largo período de almacenamiento (Gallego *et al.*, 2015; Botaris *et al.*, 2015; Braz *et al.*, 2017).

La naturaleza psicotrófica de la bacteria le confiere la capacidad de multiplicarse en condiciones de enfriamiento. Diversos estudios realizados han demostrado que la leche cruda puede estar contaminada con *Listeria spp.* y *L. monocytogenes* (Walland *et al.*, 2015). La presencia de *Listeria spp.* en muestras de leche de bovinos de países fuera de Europa, oscila entre el 2.1% y el 39.6%, mientras que *L. monocytogenes* varía desde 0 hasta 8.9%. Dentro de la Unión Europea (UE), las frecuencias de ocurrencia de *L. monocytogenes* en leche cruda de vacas varían de cero a 10.1% (Botaris *et al.*, 2015).

2.4.5 *Mycobacterium bovis*

La tuberculosis bovina (Tbb) es causada por el bacilo *Mycobacterium bovis*, bacteria de crecimiento lento e intracelular obligado, de distribución mundial y capaz de infectar a diferentes especies animales y al hombre. Esta enfermedad causa pérdidas económicas en la ganadería y representa un riesgo para la salud pública; la participación de *M. bovis* en humanos en México ha sido estimada en 7%, mientras que en sur de los Estados Unidos de Norteamérica (USA) llega al 40% de todos los casos de tuberculosis (Milián *et al.*, 2012; Nugent *et al.*, 2017).

La resistencia a la infección por *M. bovis* en el ganado es compleja, a partir de estudios genéticos cuantitativos se ha demostrado que la resistencia a la

infección está asociada a la variación genética del huésped. La tuberculosis bovina es una enfermedad crónica, con un desarrollo progresivo que tarda meses e incluso años en manifestarse, las lesiones aparecen en la interacción de los macrófagos, linfocitos T y la bacteria, donde se forman tubérculos en el foco infeccioso buscando detener la diseminación de *M. bovis* en el organismo, si la infección no es controlada, las lesiones sufren un proceso de necrosis, caseificación y fibrosis.

Los nódulos se encuentran en órganos ricos en tejido retículo-endotelial, principalmente en los pulmones, ganglios linfáticos asociados, en el bazo, y el hígado. La transmisión de *M. bovis* depende de varios factores, como la fase de excreción, la ruta infecciosa, la dosis de infección, el tiempo de transmisión, y la resistencia del huésped. Se transmite sin depender de la edad, el sexo y por ser de evolución lenta y progresiva, la presencia de signos clínicos se observa más en animales viejos, convirtiéndose en portadores asintomáticos y fuente de infección. Las micobacterias son expulsadas del organismo por secreciones respiratorias, calostro, leche, heces, orina y, en ocasiones por el semen.

En el bovino, la eliminación del bacilo por la vía respiratoria y la inhalación de partículas infectadas contenidas en la tos es la principal ruta de transmisión de la tuberculosis; considerando como factor de riesgo al hacinamiento de animales, el manejo en la sala de ordeño y alimentación. La vía oral es la segunda ruta de contagio de *M. bovis*; se da por el consumo de forraje, pienso y agua contaminada con orines, heces o cualquier exudado que contenga bacilos tuberculosos. La resistencia del microorganismo en el medio ambiente está limitada por factores climáticos, puede sobrevivir por hasta 6 meses en ambientes óptimos. Investigaciones recientes revelan la presencia de *M. bovis* en la leche y el calostro bovino, apareciendo como nuevo vehículo transmisor principalmente en los terneros, la infección de la glándula mamaria no es visible tempranamente, y las bacterias pueden alterar la apariencia de la leche.

2.4.6 *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis (MAP)

La paratuberculosis (PTBC) o enfermedad de Johne es una enfermedad infecciosa producida por *Mycobacterium avium* subsp paratuberculosis (Eltholth et al., 2009). La enfermedad se caracteriza por una enteritis crónica, con síntomas como diarrea intermitente, desmejoramiento progresivo y, finalmente, la muerte del animal. La enfermedad produce pérdidas económicas significativas a los productores y a la industria láctea. Esta pérdida se debe a costos directos e indirectos que produce la enfermedad, tales como mortandad de animales enfermos, disminución de la producción láctea, disminución de los índices de preñez, mala conversión alimenticia, pérdida del valor genético y gastos asociados al reemplazo prematuro y venta de animales a planta de matanza en mal estado corporal.

Las vacas infectadas con Map excretan la bacteria en el calostro y en la leche, esto constituye un riesgo para la transmisión de la enfermedad a los terneros. La transmisión de MAP desde las madres infectadas se produce con una cantidad mínima de microorganismos, suficiente para infectar a los terneros que desarrollaran posteriormente la enfermedad. Aunque la excreción de Map desde la glándula mamaria de vacas infectadas es intermitente, resulta en un potencial riesgo de contagio cuando los terneros son alimentados diariamente con leche infectada proveniente de varias vacas paratuberculosas (Paolicchi *et al.*, 2007).

III. HIPÓTESIS

4.1 Hipótesis

El tratamiento térmico es capaz de eliminar patógenos del calostro materno potencialmente peligrosos para el becerro recién nacido en los hatos lecheros.

IV. OBJETIVOS

4.2 Objetivo General:

Determinar la eficacia de los pasteurizadores de establo sobre la disminución de la carga bacteriana del calostro bovino.

4.2.1 Objetivos específicos:

Evaluar la calidad microbiológica en muestras de calostro bovino antes y después del tratamiento térmico, mediante el recuento de microorganismos indicadores y presencia o ausencia de microorganismos patógenos.

Determinar el tiempo de reducción decimal de *Salmonella entérica* y *Staphylococcus aureus* en calostro bovino.

V. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 Muestreo

De 22 unidades de producción lechera se obtuvieron, directamente de los tanques, tres muestras de 50 ml pre-tratamiento y tres muestras de 50 ml post-tratamiento de calostro en tres días diferentes. Las muestras fueron colocadas en tubos falcón de 50 ml y guardadas en una hielera con anticongelantes para su transporte al Laboratorio de Microbiología en la Facultad de Ciencias Naturales de la Universidad Autónoma de Querétaro, donde fueron guardadas en un congelador a -20 °C hasta su análisis. Cada muestra fue identificada con un código para cada una de las unidades de producción. También se capturó la marca y las características del aparato de tratamiento térmico, tiempo del tratamiento y temperatura usada.

Los microorganismos buscados en las muestras de calostro fueron: *Salmonella enterica*, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Mycobacterium avium* subsp *paratuberculosis*, *Mycobacterium bovis* y *Brucella abortus*. Así como el recuento de microorganismos indicadores (coliformes totales, *Escherichia coli*).

5.2 Determinación microbiológica

5.2.1 Determinación microbiológica empleando placas de detección rápida *Compact Dry*.

5.2.1.1 Determinación de Coliformes totales y *Escherichia coli*.

La detección microbiológica de Coliformes totales, se llevó a cabo por medio del cultivo en placas *Compact Dry* EC. Las tres muestras por unidad de producción fueron mezcladas en pool (POOL-A: antes del tratamiento térmico; POOL-B: después del tratamiento térmico), de este pool se tomó 1 ml de muestra y se colocó en la placa *Compact Dry* EC para su cultivo a 37 °C por 24 horas. Después del tiempo de incubación la determinación de la presencia de coliformes totales fue

dada por el conteo de las unidades formadoras de colonias (UFC) de color rojo o rosa y la presencia de *E. coli* fue dada por el conteo de las UFC de color azul o verde azulado.

5.2.1.2 Determinación de la presencia de *Salmonella spp.*

La detección microbiológica de *Salmonella spp.*, se llevó a cabo por medio del cultivo en placas *Compact Dry SL* (HyServe), las tres muestras antes del tratamiento térmico se mezclaron en pool, de este pool se tomaron 100 μ L de muestra para ser mezclados con 900 μ L de buffer de agua peptonada como tratamiento de pre-enriquecimiento por 18h a 37 °C, el mismo procedimiento se llevó a cabo para las muestras después del tratamiento térmico.

Posteriormente se tomaron 100 μ L del cultivo pre-enriquecido y se llevó a una placa *Compact Dry SL* donde se añadió 1 ml de agua destilada estéril para la dispersión correcta de la muestra (en esta etapa se emplearon duplicados en caja). El tiempo de incubación fue de 24h a 41 °C. *Compact Dry SL* contiene un sustrato cromogénico y Novobiocin, con lo que la detección de *Salmonella* se basa en la alcalinización del medio por la capacidad de descarboxilación de lisina de *Salmonella*. El color del medio cambia de azul-púrpura a amarillo y la coloración de las colonias puede tornarse negra debido al sulfuro de hidrógeno producido por *Salmonella*.

5.2.1.3 Determinación de *Staphylococcus* y *Listeria spp.*

La detección microbiológica de *Staphylococcus spp.*, se llevó a cabo por medio del cultivo en placas *Compact Dry X-SA*. Las tres muestras por unidad de producción fueron mezcladas en pool (POOL-A: antes del tratamiento térmico; POOL-B: después del tratamiento térmico), de este pool se tomó 1 ml de muestra y se colocó en la placa *Compact Dry X-SA* para su cultivo a 37 °C por 24 horas. Después del tiempo de incubación la determinación de la presencia de

Staphylococcus spp., fue dada por el conteo de las unidades formadoras de colonias (UFC) de color azul.

Para la determinación de la presencia de *Listeria spp.*, se llevó a cabo la metodología descrita para *Staphylococcus spp.* empleando las placas Compact Dry LS.

5.2.2 Determinación microbiológica por método tradicional.

5.2.2.1 Cuantificación de Coliformes totales.

Las tres muestras antes del tratamiento térmico fueron mezcladas en pool, de este pool se tomaron dos alícuotas de 15 ml, cada alícuota fue diluida en 135 ml de caldo lactosado (primera dilución), para la segunda dilución se tomó 1 ml de la primera dilución y se llevó a un tubo de ensaye con 9 ml de diluyente de peptona. Este procedimiento se llevó a cabo para las dos alícuotas. Tanto el procedimiento de la formación de pools, así como la formación de las diluciones, se repitieron para las muestras post-tratamiento térmico.

De cada dilución se tomó 1 ml y se llevó a cabo la técnica de vaciado en placa en medio Agar de Bilis y Rojo Violeta (ABRV) incubando a 37 °C durante 24 horas para posteriormente realizar el conteo en placa.

5.2.2.2 Cuantificación de *Escherichia coli* por la técnica del número más probable (NMP)

De las diluciones realizadas para el recuento de coliformes totales se colocaron de manera independiente 1 mL a cada uno de tres tubos de caldo lactosado con campana de Durham, de la primera, segunda y tercera dilución. Se incubaron a 35°C por 24-48 horas, los tubos que presentaban turbidez y gas se consideraban presuntos positivos.

Los presuntos positivos se confirmaron en medio EC-MUG con campana de Durham y agua peptonada (1%), ambos medios se llevaron a incubación durante 24 horas a 44.5 °C. Después de la incubación, la confirmación de la positividad se

determinó por la presencia de gas en las campanas de Durham, fluorescencia de bajo luz ultravioleta (en el medio EC-MUG) y producción de Indol (en el agua peptonada 1%) a partir del triptófano mediante la reacción positiva ante el reactivo de Kovac. Todo el procedimiento se repitió para las muestras pos tratamiento térmico.

5.2.2.3 Determinación de presencia de *Salmonella spp.*

Las tres muestras por unidad de producción fueron mezcladas en pool, de este pool se tomó una alícuota de 25 ml, donde el primer paso para la determinación de *Salmonella spp.* fue el pre-enriquecimiento no selectivo de la alícuota, empleando caldo lactosado, con un tiempo de incubación de 18 a 24 h; seguido de un enriquecimiento selectivo con los medios Rappaport Vasilliadis (RPVS) y el caldo tetracionado (CTT), en simultáneo, con una temperatura de 43°C durante 24 horas. Posterior al pre-enriquecimiento se llevó a cabo el aislamiento selectivo en los medios XLD, ASV y AVB, también en simultáneo, durante 24 horas a 35 °C.

Finalmente, para la identificación de *Salmonella*, a las colonias sospechosas (morfología colonial) se realizaron las pruebas bioquímicas de fermentación de lactosa y glucosa con producción de ácido sulfhídrico (Agar Hierro-Triple azúcar, por sus siglas en ingles TSI) y descarboxilación de la lisina con producción de ácido sulfhídrico Agar de Hierro-Lisina (por sus siglas en ingles LIA). Las colonias positivas a *Salmonella* se confirmaron con el antisero polivalente específico para *Salmonella A-I&Vi* esta metodología descrita está basada en la Norma Oficial Mexicana NOM-114-SSA1-1994. Bienes y servicios. Método para la determinación de *Salmonella* en alimentos.

5.2.2.4 Determinación de *Brucella abortus.*

Para llevar a cabo el aislamiento e identificación de este microorganismo se cultivaron las muestras en el medio de cultivo de Farrell.

5.2.2.5 Determinación de *Staphylococcus aureus*

A partir de los pools formados previamente se tomó una alícuota de 1 ml, para realizar una dilución 1:10 en diluyente de peptona (DP), se llevó a cabo el recuento por la técnica de extensión en superficie en medio Agar Baird Parker (ABP) a 35°C por 24-48 horas. A partir de este cultivo colonias sospechosas fueron transferidas al caldo infusión cerebro-corazón (BHI) durante 24 horas a 35°C. Finalmente, para la determinación específica de *Staphylococcus aureus* se llevaron a cabo las pruebas de coagulación de plasma sanguíneo y la prueba de termonucleasa empleando agar azul de toluidina.

5.2.2.6 Determinación de la presencia de *Listeria monocytogenes*.

Para determinar la presencia de *Listeria monocytogenes*, las 3 muestras pretratamiento y pos tratamiento fueron mezcladas en pool por separado. De cada uno del pool se tomaron 2 alícuotas de 15 ml para ser diluidos en 135 ml de caldo LEB como pre-enriquecimiento selectivo, incubando a 35°C por 48 horas. Posterior al tiempo de incubación las muestras fueron estriadas en agar MOX (Agar Oxford Modificado), donde las colonias con morfología característica del género *Listeria* fueron inoculadas en agar SIM (Sulfuro-Indol-Movilidad) e incubados a temperatura ambiente por 24 horas. En este medio de cultivo se observó la movilidad de la colonia producida por los flagelos característicos del género *Listeria*. Colonias positivas a movilidad típica se confirmaron con antisueros O 4b para *Listeria*.

5.2.2.7 Determinación de presencia de *Mycobacterium bovis*.

Para determinar la presencia de *Mycobacterium bovis* se realizaron cultivos en medio Stonebrink empleando la técnica de Petroff modificada (Kahla *et al.*, 2011), donde las tres muestras por unidad de producción antes del tratamiento térmico fueron mezcladas para formar 2 pools (POOLA1 y POOLA2). Las tres muestras por unidad de producción después del tratamiento térmico fueron también mezcladas para formar 2 pools (POOLB1 y POOLB2).

Para las pruebas se tomaron 10 ml del calostro, posteriormente se añadieron 20 mL de HCL 10% junto con 2 gotas de indicador rojo de fenol al 1%, y se dejaron reposar durante 20 minutos (**Anexo 9.1**). Después del tiempo de incubación se añadió hidróxido de sodio 2N hasta observar que el indicador cambiara a un color lila morado. Se centrifugó a 3000 rpm durante 20 minutos, el pellet se re-suspendió en agua destilada estéril. A partir de la solución obtenida se tomaron dos gotas para su cultivo, y se incubó a 37°C durante 3 meses.

5.2.2.8 Determinación de *Mycobacterium avium*, subespecie paratuberculosis (MAP).

Para realizar el análisis de la presencia de MAP por cultivo se tomó 1ml del pool de muestra de calostro, se homogenizó en 10 ml de HPC con un mezclador TenBroek. El homogenizado fue descontaminado por 4h en 0.75% de HPC, y luego se centrifugó a 900G por 30 minutos.

El pellet formado se re-suspendió en 1 ml de caldo Middlebrook 7H9 (Difco Laboratories, Detroit, Mich.), y 5 gotas fueron inoculadas en medio Herrold's egg yolk (HEYM) con Micobactina e incubado a 37°C por 16 semanas. Los tubos de cultivo fueron revisados cada dos semanas para detectar crecimiento Micobacteriano. Las colonias de bacterias ácido no resistentes fueron sub-cultivadas para probar dependencia a la Micobactina. Bacterias de crecimiento lento dependientes de Micobactina con morfología apropiada de la colonia y tinción ácida rápida fueron identificadas como *M. paratuberculosis*. El número de colonias por tubo de cultivo fueron registradas por cada cultivo positivo. Los conteos de colonias por cada cuatro tubos de cultivo corresponden a aproximadamente 40 a 80 CFU por mL de calostro.

5.3 Determinación del tiempo de reducción decimal (valor D) de *Salmonella entérica* y *Staphylococcus aureus* en calostro bovino.

La determinación del valor D de *Salmonella* en calostro bovino se llevó a cabo de la siguiente manera. Se tomó una muestra de calostro de primera ordeña no tratado térmicamente y se formaron alícuotas de 5 ml en tubos cónicos a cada tubo se les adicionaron 100 µl de un pool de *Salmonella entérica* resistente a 100 ppm de Rifampicina (*Salmonella* Thypimurium, *Salmonella* Thompson y *Salmonella* Montevideo) con una concentración de 10^8 células/ml. Las muestras de calostro inoculadas se sometieron a un tratamiento térmico de 60°C durante 60 minutos, se tomaron 3 muestras al azar en los tiempos 0, 5, 10, 20, 30, 40, 50 y 60 minutos, para ser cultivadas por triplicado en cajas Petri en el Agar Soya Trypticosa, suplementado con 100 ppm de Rifampicina, e incubado a 35 °C durante 24 horas. Al término del tiempo de incubación se realizó el recuento de las células sobrevivientes para contruir la curva de muerte térmica y determinar el valor D de *Salmonella* en el calostro bovino.

Se llevó a cabo siguiendo la misma metodología la determinación del valor D en una cepa de *Staphylococcus aureus* resistente a Rifampicina.

VI RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1 Resultados de la determinación de la presencia de microorganismos empleando placas *Compact Dry*.

A partir de los cultivos de las muestras de calostro en las placas *Compact Dry* se determinó la presencia o ausencia de las familias a las cuales pertenecen los microorganismos de interés, esto debido a que para corroborar familia y especie deben llevarse a cabo pruebas bioquímicas que confirmen la presencia o ausencia de familia y especie específica. Todos los resultados obtenidos empleando *Compact Dry* son presuntivos, motivo por el cual se desarrolló la metodología empleando métodos tradicionales que incluyen pruebas bioquímicas confirmatorias.

6.1.1 Microorganismos indicadores (*Coliformes* y *E. coli*)

La cuantificación de microorganismos indicadores se realizó en las 22 unidades de producción. Desafortunadamente no se consideraron diluciones apropiadas por lo que no se tuvo un recuento confiable de UFC. Las placas presentaban un desarrollo excesivo (demasiado numerosas para contar e identificar) por lo que solo se consideró de manera cualitativa la presencia de *E. coli* relacionándola con una posible contaminación fecal en 19 de 22 unidades de producción antes del tratamiento térmico, y en 11 de ellas aún después del tratamiento térmico. *E. coli*, así como los Coliformes totales, no son termodúricos, de tal manera que su presencia después de un tratamiento térmico indica una deficiencia en el funcionamiento y operación del equipo, o un mal manejo higiénico del producto post- proceso. De las 11 unidades con aparente desarrollo de *E. coli* después del tratamiento térmico, dos no lo presentaban antes del tratamiento, situación que refuerza la teoría de una posible contaminación post-proceso. En la figura 1 se muestra la morfología característica de colonias de *E. coli* en las placas *compact Dry EC* donde las colonias deben presentar una coloración azul o azul-púrpura.

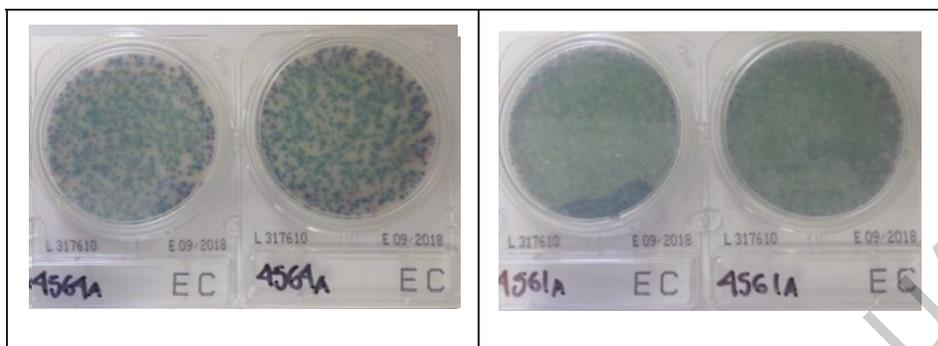


Figura 1. Morfología característica de *E. coli* en placas Compact Dry EC.

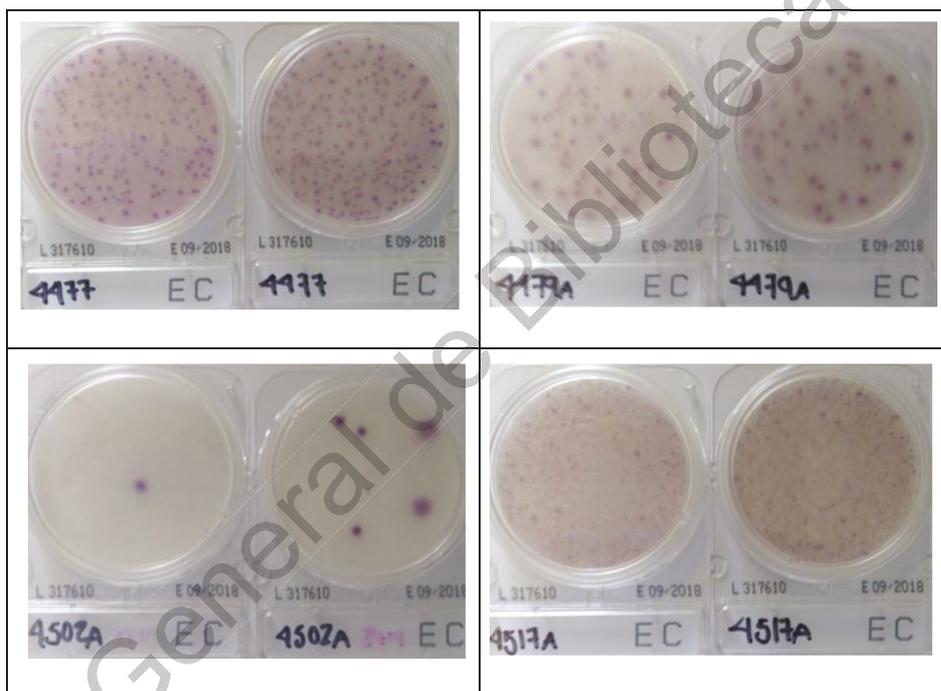


Figura 2. Morfología característica de Coliformes totales en placas Compact Dry EC

La misma situación se observó en la determinación de Coliformes totales, indicadores de malas prácticas higiénicas. En los análisis de las muestras de 20 unidades de producción se encontró la morfología característica de estos microorganismos antes del tratamiento, y después del tratamiento térmico el número de presuntos positivos disminuye en un 20%. De las 16 unidades de producción positivas después del tratamiento térmico, una fue negativa antes del tratamiento y positiva después de este, con lo que se reitera la contaminación ambiental pos tratamiento. En la figura 2 se muestra la morfología típica de las colonias de Coliformes totales en algunas de las muestras analizadas, las colonias

típicas de Coliformes totales en este tipo de placas deben presentar una coloración roja o rosa.

6.1.2 Determinación de la presencia de microorganismos patógenos (*Salmonella spp.*, *Staphylococcus spp.* y *Listeria spp.*)

Todas las unidades de producción fueron negativas a *Salmonella spp.* En el caso de *Staphylococcus spp.*, se observó que las muestras de 11 unidades de producción fueron positivas antes del tratamiento térmico y 4 positivas después de este tratamiento.

En la figura 3 se muestra la morfología de las colonias positivas a *Staphylococcus spp.* en las placas compact Dry X-SA, donde las colonias deben observarse en color azul. Sin embargo, el desarrollo excesivo no permite tener una identificación adecuada del microorganismo, y no se realizó una identificación bioquímica, por lo que estos resultados deben tomarse con reservas.

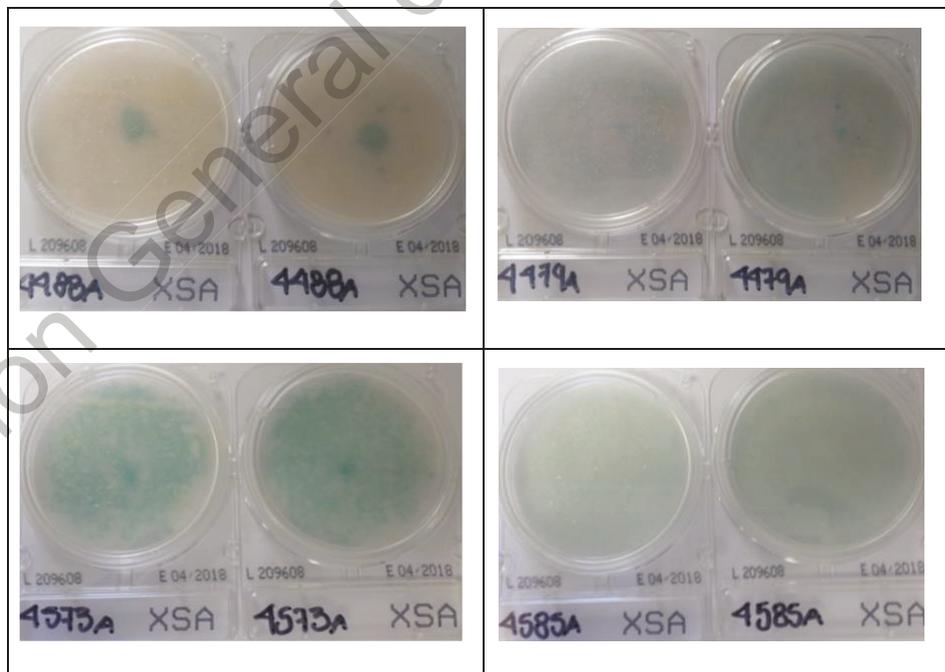


Figura 2. Morfología característica de *Staphylococcus spp.* en placas Compact Dry X-SA.

Por parte de *Listeria spp.*, las muestras de 20 unidades de producción fueron positivas antes del tratamiento térmico y 19 positivas postratamiento. En la figura 4 se observan muestras positivas al genero *Listeria* en las placas Compact Dry LS. De igual manera, los resultados deben considerarse presuntos positivos porque no se llevó a cabo la identificación del microorganismo. Cabe destacar que los microorganismos que mostraron menor disminución después del tratamiento térmico empleando como método de determinación las placas Compact Dry, fueron los asociados al género *Listeria*.

Los cultivos empleando placas *Compact Dry* descritas en este trabajo no permitieron un conteo de unidades formadoras de colonias debido a que la dilución analizada no permitió tener un número de colonias entre 25 y 250, es decir, era demasiado numeroso para contar; sin embargo, y debido a la característica de cambios de color en las placas, fue posible determinar la presencia de bacterias por la intensidad del color, lo que implica actividad bioquímica.

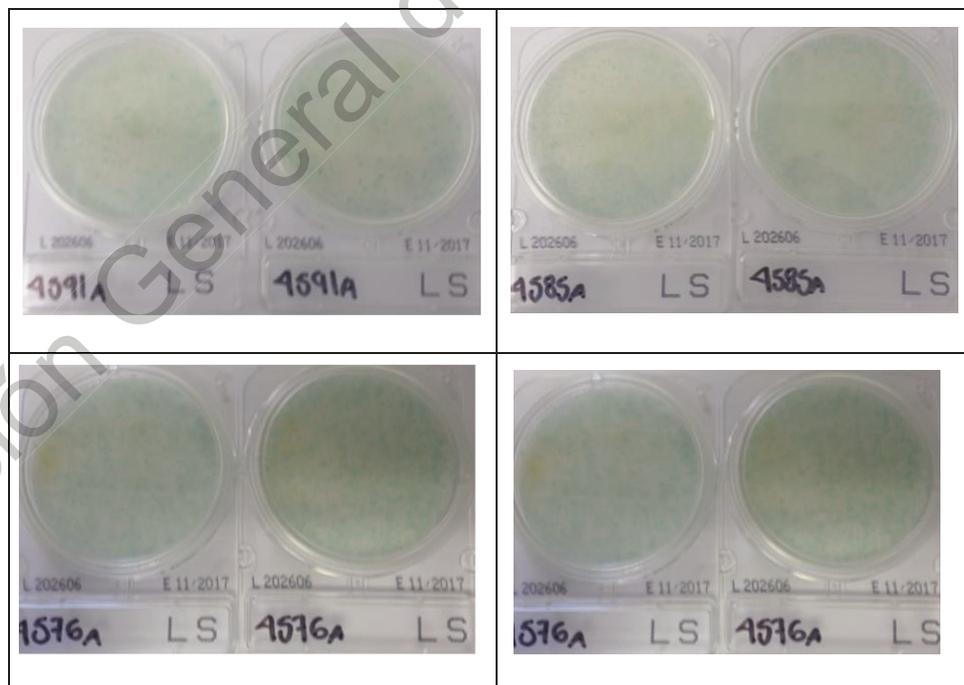


Figura 3. Morfología característica de *Listeria spp.* en placas Compact Dry LS.

En el cuadro 2 se puede observar los resultados de los cultivos en placas Compact Dry mostrando la intensidad de aparición. La actividad bioquímica no fue la misma en todas las muestras analizadas, es notoria la diferencia morfológica entre las muestras analizadas, además de que la intensidad de coloración producto de la actividad bioquímica es distinta en cada una de las muestras, por lo que se recurrió a hacer una estimación de la positividad clasificando por intensidad de desarrollo en cada uno de los tipos de cultivo.

Cuadro 2. Resultado del análisis de muestras de calostro pre y post tratamiento térmico utilizando placas Compact Dry. Muestras positivas a Coliformes Totales, *E.coli*, *Salmonella* spp., *Staphylococcus* spp. y *Listeria* spp.

ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO		
Microorganismo	POSITIVOS ANTES	POSITIVOS DESPUÉS
Coliformes totales	20 (7*, 7**, 6***)	16 (3*, 8**, 5***)
<i>E. Coli</i>	19 (5*, 4**, 10***)	8 (3*, 2**, 3***)
<i>Salmonella</i> spp.	0	0
<i>Staphylococcus</i> spp.	11 (6*, 2**, 3**)	4 (3*, 1**)
<i>Listeria</i> spp.	21 (5*, 9**, 7***)	19 (10*, 5**, 4***)
*Pocas colonias, ** mayor número de colonias, ***incontable número de colonias		

En el cuadro 3 se observa la proporción de unidades de producción que mostraron la morfología característica de los microorganismos indicadores y patógenos buscados considerando únicamente presunta positividad o negatividad en las muestras analizadas.

Cuadro 3. Proporción de unidades de producción con posible presencia de microorganismos indicadores y patógenos antes y después del tratamiento térmico.

Análisis microbiológico			
Positivos a:	Antes (%)	Después (%)	Disminución del tratamiento (%)
Coliformes totales	90.9	72.7	20
<i>Escherichia coli</i>	86.4	36.4	57.9
<i>Salmonella spp.</i>	0	0	0
<i>Staphylococcus spp.</i>	50	18.2	64
<i>Listeria spp.</i>	90.9	86.4	5

6.2 Resultados de los cultivos microbiológicos empleando métodos tradicionales.

6.2.1 Microorganismos indicadores.

De 18 unidades de producción, los calostros de 14 fueron positivas al conteo de Coliformes totales en el pre tratamiento y 9 positivas también en el pos tratamiento, todas con niveles superiores a lo especificado en la Norma Oficial Mexicana NOM-243-SSA1-2010, “**productos y servicios. Leche fórmula láctea, producto lácteo combinado y derivados lácteos**” (Figura 5). La comparación fue hecha entre los resultados obtenidos para el calostro después del tratamiento térmico y los valores permitidos en la norma para producto procesado en planta. Dentro de las especificaciones de esta norma se establece un máximo de 10 UFC por mL para el producto procesado en planta, por lo que todas las unidades de producción, con valores superiores al antes mencionado después del tratamiento térmico, no cumplen con lo establecido en esta norma, lo que revelan malas prácticas higiénicas pudiendo ocasionar problemas de salud en los neonatos.

Se desarrolló toda la metodología descrita para la determinación de *E.coli* mediante la técnica del número más probable, resultando negativas todas la muestras analizadas. A partir de estos resultados podríamos considerar que los

positivos detectados en las placas compact Dry son negativos, esta conclusión deriva de la sensibilidad y especificidad de la técnica del NMP frente a la sensibilidad y especificidad de las placas Compact Dry, una explicación a confirmar sería que algunos componentes del calostro pudieran dar la reacción cromogénica en el medio de cultivo de las placas Compact Dry.

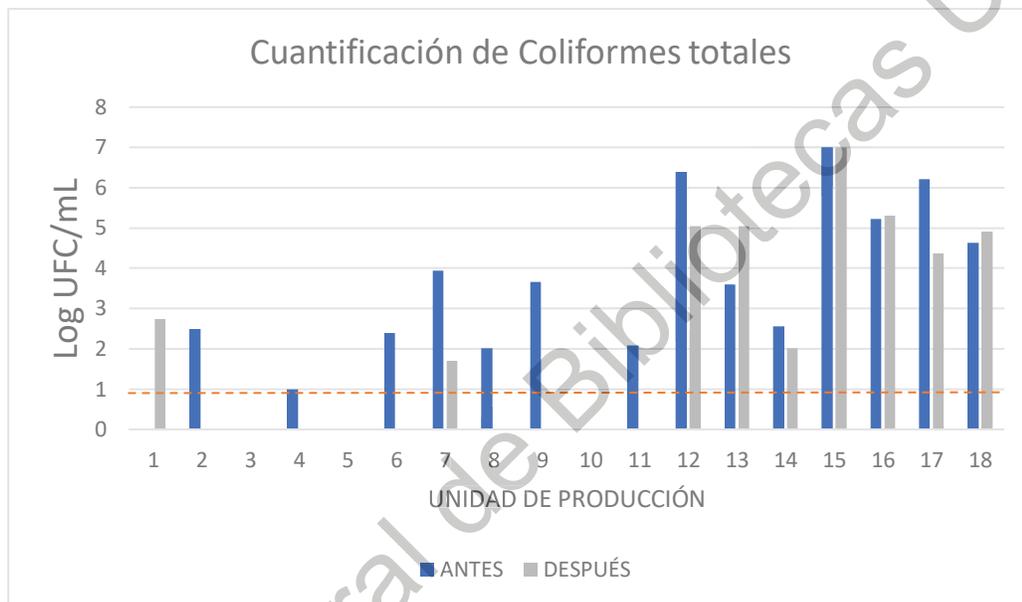


Figura 4. Recuento de Coliformes totales (UFC/mL- Log10) antes y después del tratamiento térmico, en 18 unidades de producción que emplean equipos DairyTech.

Las unidades de producción fueron analizadas en cuanto a su positividad antes y después del tratamiento térmico, en el cuadro 4 se observa el análisis por unidad de producción donde 8 unidades resultaron positivas antes del tratamiento térmico y después de este, lo que puede significar que en estas unidades el tratamiento térmico del calostro no tiene ningún efecto sobre la cantidad y presencia de Coliformes totales o que se está propiciando la contaminación post-proceso. En 6 de las 18 unidades de producción analizadas el tratamiento térmico cumple con la función de disminuir la carga bacteriana, una unidad de producción resultó negativa antes del tratamiento térmico y positiva después, este efecto puede asociarse a malas prácticas de manejo en la unidad de producción después del tratamiento. Y,

finalmente, tres unidades de producción resultaron negativas antes y después del tratamiento térmico.

Cuadro 4. Muestras de calostro positivas y negativas al cultivo en agar de bilis y rojo violeta.

Tratamiento térmico		Microorganismo	
Antes	Después	Coliformes totales en agar bilis-rojo violeta (n=18)	
		Unidad de producción	%
+	+	8	44
+	-	6	33
-	+	1	5
-	-	3	16

Los resultados obtenidos para el recuento de Coliformes totales en agar de Bilis y Rojo Violeta en las 18 unidades se comparan con los obtenidos por [Godden en 2012](#) (Figura 6). Se puede observar que en los experimentos realizados por este autor los valores de la media de los Coliformes totales antes del tratamiento térmico son de 4.7 (Log₁₀, UFC/mL) y de 2.1 (Log₁₀, UFC/mL) y después del tratamiento térmico.

Para el presente trabajo los valores promedio obtenidos fueron 2.96 (Log₁₀, UFC/mL) antes del tratamiento y 2.12 (Log₁₀, UFC/mL) después del tratamiento térmico en las unidades de producción analizadas. La disminución de la carga bacteriana en los trabajos de Godden es de 2.6 (Log₁₀, UFC/mL) mientras que la disminución promedio en los análisis de este trabajo es de 0.84 (Log₁₀, UFC/mL). Ambos trabajos refieren un valor promedio después del tratamiento térmico de 2.1 (Log₁₀, UFC/mL) sin embargo difieren del número inicial de microorganismos.

Con respecto a las condiciones de salud, [Godden en 2012](#) demuestra experimentalmente las ventajas y desventajas de realizar o no un tratamiento térmico, como se muestra en la figura 7, el tratamiento tiene efecto sobre la disminución de algunas enfermedades, y sobre la presencia de diarreas, sin embargo, no tiene efecto sobre las enfermedades respiratorias ni la morbilidad.

Figura 5. Resultados obtenidos por Godden en 2012 en el análisis de calostro fresco y calostro tratado térmicamente.

Variable	Fresh	Heat-treated
Calves (no.)	518	533
Calving ease score (1-5)	1.4 (0.74, 1 to 5)	1.4 (0.74, 1 to 4)
Age at first feeding (min)	47.5 (42.8, 0 to 520)	50.0 (36.9, 0 to 195)
Age at blood sample collection (d)	4.0 (2.2, 1 to 9)	4.0 (2.2, 1 to 8)
In colostrum fed:		
IgG (mg/mL)	63.9 (20.4, 16.3 to 139.9)	61.1 (19.2, 12.1 to 139.5)
Total plate count (log ₁₀ , cfu/mL)	5.6 (0.9, 2.6 to 9.1)	3.5 (1.1, 1 to 8.4)
Total coliform count (log ₁₀ , cfu/mL)	4.7 (1.3, 0 to 6.8)	2.1 (1.6, 0 to 7.0)
Total plate count ² (cfu/mL)	515,000 (390 to 1.2 × 10 ⁹)	2,100 (10 to 2.4 × 10 ⁶)
Total coliform count ² (cfu/mL)	51,500 (0 to 6.7 × 10 ⁶)	90 (0 to 9.5 × 10 ⁶)

¹Mean (SD, range).

²Median (range).

Figura 6. Resultados obtenidos por Godden en 2012 donde se demuestra el efecto del tratamiento térmico del calostro sobre el riesgo de morbilidad y mortalidad en terneros.

Outcome parameter	Treatment group	Affected, % (no.)	Estimate (SE)	Hazard ratio _{Fresh}	P-value
Treatment for any disease	FR (n = 518)	36.5 (189)	0.22 (0.073)	1.25 (1.08, 1.44)	0.0022
	HT (n = 553)	30.9 (171)	Referent		
Treatment for scours	FR (n = 518)	20.7 (107)	0.27 (0.076)	1.32 (1.14, 1.53)	0.0003
	HT (n = 553)	16.5 (91)	Referent		
Treatment for respiratory disease	FR (n = 518)	11.4 (59)	-0.00062 (0.012)	0.99 (0.98, 1.02)	0.96
	HT (n = 553)	9.4 (52)	Referent		
Death	FR (n = 518)	1.7 (9)	0.15 (0.20)	1.16 (0.78, 1.72)	0.46
	HT (n = 553)	2.4 (13)	Referent		

¹Herd controlled for as random effect in all models.

6.2.2 Microorganismos patógenos.

6.2.2.1 *Salmonella* spp.

Siguiendo los lineamientos de la Norma Oficial Mexicana NOM-114-SSA1-1994. “**Bienes y servicios. Método para la determinación de *Salmonella* en alimentos**”, de las 18 muestras de calostro analizadas, ninguna fue positiva a este patógeno.

6.2.2.2 *Brucella abortus*.

Con base a la metodología descrita para la determinación de la presencia de *Brucella abortus*, se determinó la ausencia de este microorganismo en todas las unidades de producción analizadas (**Anexo 9.7**).

6.2.2.3 *Staphylococcus aureus*.

De 18 unidades de producción, los calostros de 17 mostraron abundante desarrollo en placas de Agar Baird Parker, antes y después del tratamiento térmico (Figura 9); sin embargo, ninguna colonia fue positiva a *Staphylococcus aureus*, confirmando con los procedimientos de la Norma Oficial Mexicana NOM-115-SSA1-1994. “Bienes y servicios. Método para la determinación de *Staphylococcus aureus* en alimentos”.

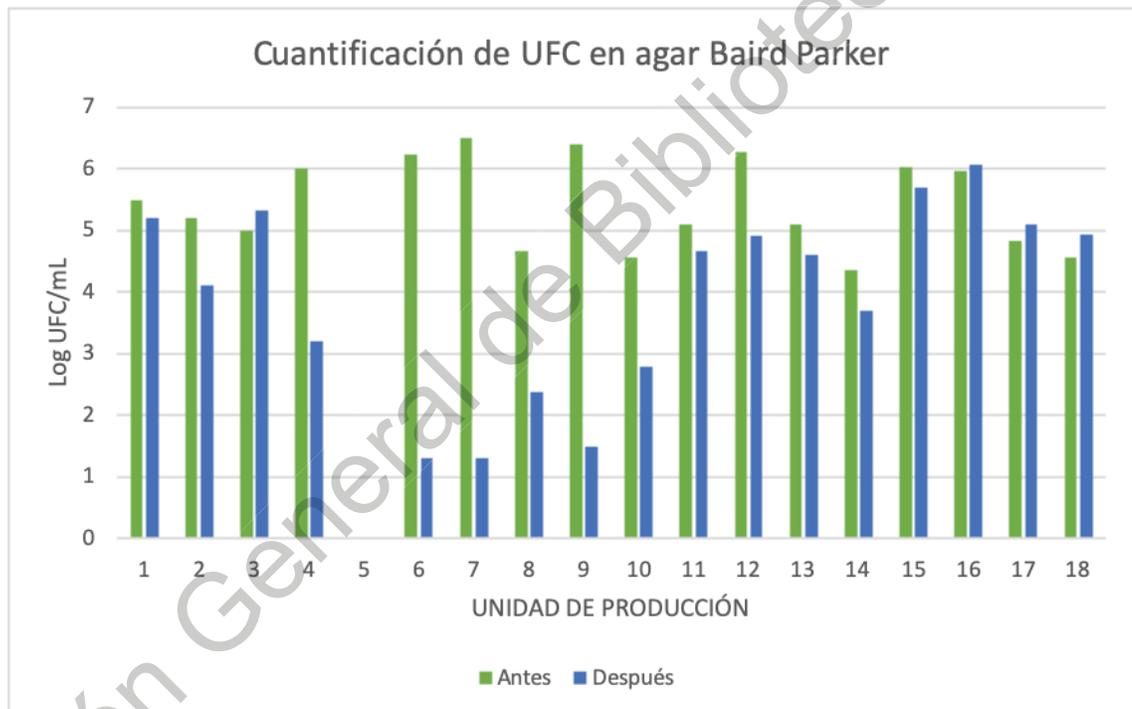


Figura 7. Recuento de UFC en agar Baird Parker a partir de calostros de unidades de producción que emplean equipos DairyTech.

6.2.2.4 *Listeria monocytogenes*.

Después de desarrollar la metodología descrita para la determinación de la presencia de este microorganismo, se determinó su ausencia en todas las unidades de producción analizadas.

6.2.2.5 *Mycobacterium bovis*.

A partir de los cultivos de calostro empleando la metodología descrita anteriormente y en anexo 9.1, se observó contaminación bacteriana en todos los cultivos de calostro a las 24 horas. Los controles positivos no mostraron contaminación en los medios de cultivo. Se modificó la metodología como se muestra en el anexo 9.2 para reducir los niveles de contaminación en los cultivos. Empleando la nueva metodología, la contaminación se observó de 24 a 48h después de iniciados los cultivos. Finalmente, se determinó que el cultivo de *M. bovis* a partir de calostro debe ser mejorado considerablemente para poder obtener los resultados requeridos.

6.2.2.6 *Mycobacterium avium* subsp. Paratuberculosis.

Los análisis realizados para la determinación de la presencia de MAP mostraron 6 unidades de producción positivas en muestras pretratamiento térmico y 3 unidades positivas del postratamiento (Anexo 9.6); las 3 unidades positivas pos tratamiento no fueron de las unidades positivas del pretratamiento, lo que evidencia contaminación postratamiento.

6.3 Determinación del valor D de *Salmonella enterica* y *Staphylococcus aureus* en calostro bovino.

Para corroborar la eficacia de los parámetros empleados en el tratamiento térmico se llevó a cabo la determinación del valor D de *Salmonella enterica* y *Staphylococcus aureus* en calostro bovino. El valor D obtenido para *Salmonella enterica* fue: $D_{60} = 5.22$ lo que significa que el 90% de la *Salmonella* presente en las muestras es eliminada en 5.22 minutos a 60°C. en la figura 10 se observa que la cantidad inicial de microorganismos corresponde a 8 Log UFC/mL, entre el minuto 10-20 se ha disminuido en más de 3 Log UFC/mL la cantidad de microorganismos. Finalmente, entre el minuto 30 y el 40, ya no se observó crecimiento del microorganismo.

El valor D obtenido para *Staphylococcus aureus* en calostro bovino fue de 10.73. En la figura 11 se observa que la cantidad inicial de microorganismos para este experimento es de 8 Log UFC/mL, entre el minuto 10 y 20 la cantidad inicial ha disminuido en aproximadamente 3 Log UFC/ mL la cantidad de microorganismos inicial, con lo que se concluye que es posible decir que el tratamiento térmico durante 60 minutos a 60 °C es adecuado para la disminución de la carga bacteriana; sin embargo, existen múltiples factores que influyen en la inocuidad del calostro.

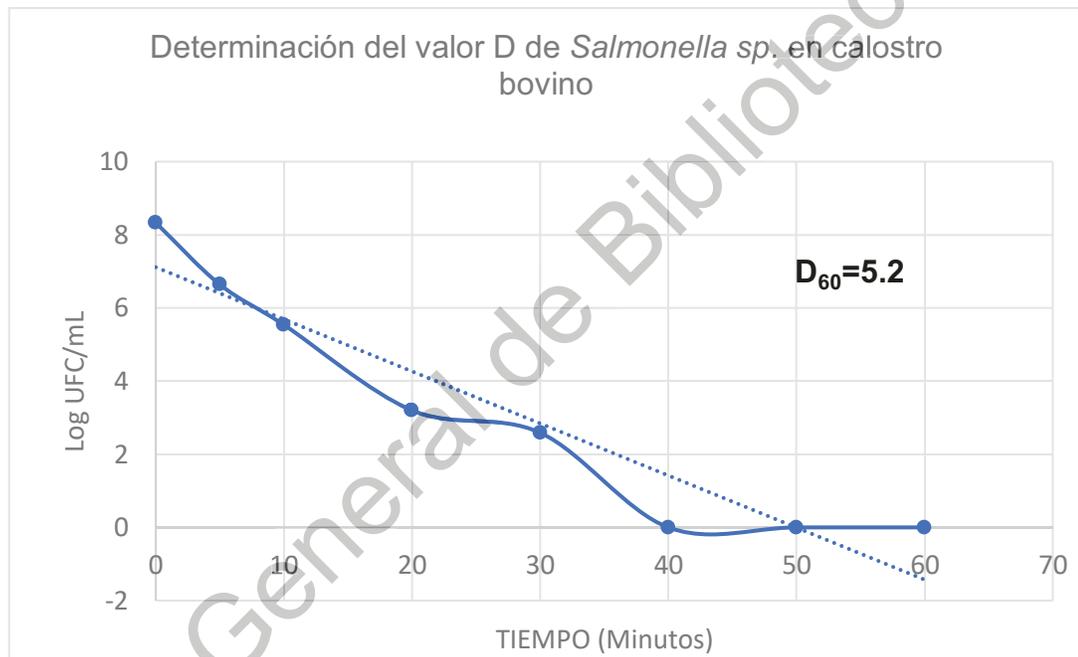


Figura 9. Valor D de *Salmonella sp.* en muestras de calostro sometido a tratamiento térmico (nivel laboratorio) a 60°C durante 60 minutos empleando un Pool de *Salmonella* resistente a rifampicina.

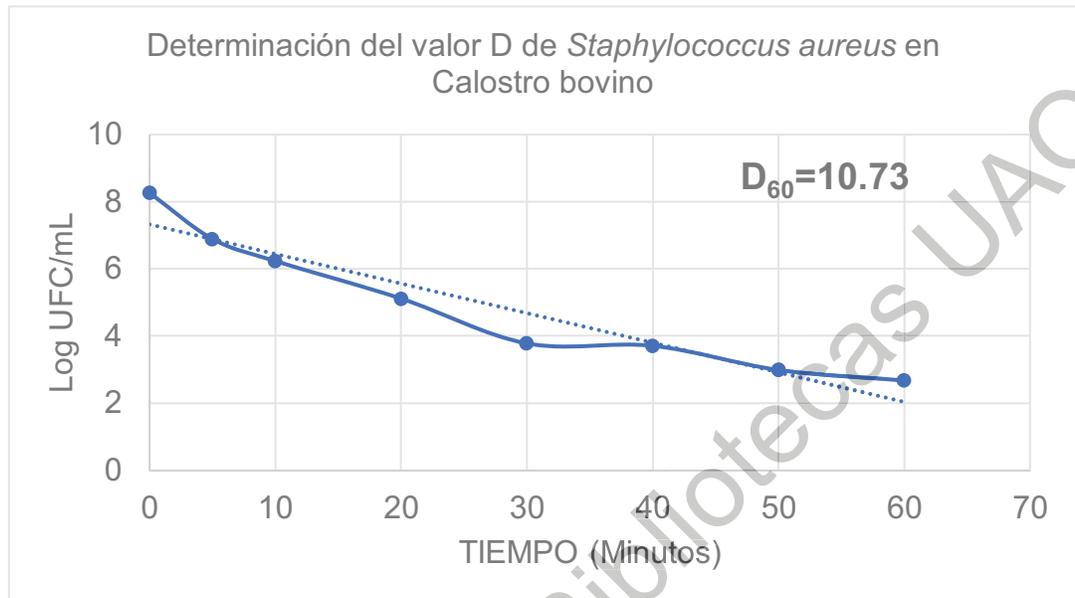


Figura 10. Valores D de *Staphylococcus aureus* en muestras de calostro sometido a tratamiento térmico (nivel laboratorio) a 60°C durante 60 minutos empleando una cepa resistente a rifampicina.

VII CONCLUSIONES

A partir de los resultados obtenidos del cultivo bacteriológico del calostro y los resultados obtenidos del valor D de *Salmonella* sp. y *Staphylococcus aureus* se concluye que las condiciones definidas para la operación del equipo *DairyTech* (60°C, 60 minutos) son adecuados para la eliminación de agentes patógenos en el calostro; sin embargo, es recomendable hacer un análisis individual de las condiciones de manejo del equipo y manejo del calostro, antes y después del tratamiento en cada unidad de producción con la finalidad de verificar que éste se lleve a cabo de acuerdo a las especificaciones o recomendaciones del proveedor (**Anexo 9.4 y 9.5**).

Los recuentos de UFC obtenidos en muestras de calostro después del tratamiento térmico podrían atribuirse a malas prácticas higiénicas que propician contaminación post-proceso. Este hecho es fácil de demostrar teniendo un control de las temperaturas de proceso.

En algunas unidades de producción se demuestra el manejo del calostro después del tratamiento térmico, dada la presencia de Coliformes totales, que teóricamente son eliminados con tratamientos por encima de los 45°C; sin embargo, a pesar de que los “pasteurizadores” en los establos utilizan condiciones óptimas de operación en los equipos DairyTech, estos microorganismos persisten o son incorporados por malas prácticas de manejo del calostro post-tratamiento térmico.

Dentro los puntos de control que se sugieren para mejorar la calidad del calostro están: verificar los tiempos de calentamiento inicial del calostro, los tiempos de enfriamiento, el lavado correcto del equipo y las conexiones, el manejo higiénico por parte de los encargados de la operación del equipo y el manejo higiénico por parte del encargado de la alimentación de los terneros.

VIII BIBLIOGRAFIA

Botsaris, G.; Nikolaou, K.; Liapi, M. & Pipis, C. Prevalence of *Listeria* Spp. and *Listeria Monocytogenes* in Cattle Farms in Cyprus using Bulk Tank Milk Samples *J. Food Saf., Wiley Online Library*, 2016, 36, 482-488

Braz, M. R., Chayer, R., Moreira, A. R., & Stilwell, G. (2017). Descripción de un caso de listeriosis en bovinos de cría en pastoreo del sudeste de la provincia de Buenos Aires. *Rev. med. vet.(B. Aires)*, 98(2), 7-11.

Butler, W. Nutritional interactions with reproductive performance in dairy cattle. *Anim. Reprod. Sci., Elsevier*, 2000, 60, 449-457.

Carolina, G. C. E. Efecto de la pasteurización de calostro bovino sobre sus propiedades fisicoquímicas, sanitarias e inmunológicas 2015.

Carrisoza, I.; Medina, M.; Palomares, E. G. & Diaz, E. Transmission of *Brucella abortus* to female calves younger than three months of age, diagnosed by the card and radial immunodiffusion tests in two dairy herds in the state of Queretaro, Mexico *Veterinaria México*, 2014, 1, 11-18.

Cervantes, E., García, R., and Salazar, P. M. (2014). Características generales del staphylococcus aureus. *Revista Latinoamericana de Patología Clínica y Medicina de Laboratorio*, 61(1):28–40.

Elizondo, J. & Heinrichs, A. Feeding heat-treated colostrum to neonatal dairy heifers: Effects on growth characteristics and blood parameters *J. Dairy Sci., Elsevier*, 2009, 92, 3265-3273.

Elizondo, J. A.; Jayarao, B. M. & Heinrichs, A. J. Pasteurización de calostro: efecto sobre la carga bacteriana y la concentración de inmunoglobulinas G. REDVET. Revista electrónica de Veterinaria, 2008, 1695, 7504.

Eltholth, M. M., Marsh, V. R., Van Winden, S., & Guitian, F. J. (2009). Contamination of food products with *Mycobacterium avium* paratuberculosis: a systematic review. *Journal of Applied Microbiology*, 107(4), 1061-1071.

Fernández Escartín, E. (2000). Microbiología e inocuidad de los alimentos. Universidad Autónoma de Querétaro. México, 295-296.

Fischer, A. J. (2017). Effects of colostrum management practices on the neonatal dairy calf.

Fortín, A. M. and Perdomo, J. J. (2009). Determinación de la calidad del calostro bovino a partir de la densidad y de la concentración de IgG y del número de partos de la vaca y su efecto en el desarrollo de los terneros hasta los 30 días de edad. B.S. tesis, Zamorano: Escuela Agrícola Panamericana, 2012.

Gallego, C. C., Gallego, M. I., Azumendi, J. L., Paipa, J., & Jaramillo, D. (2015). Desarrollo de la técnica de Interferón Gamma (IFN- γ) para la detección de bovinos infectados con *Listeria monocytogenes*. *Revista UDCA Actualidad & Divulgación Científica*, 18(1).

Godden, S.; McMartin, S.; Feirtag, J.; Stabel, J.; Bey, R.; Goyal, S.; Metzger, L.; Fetrow, J.; Wells, S. & Chester, H. Heat-treatment of bovine colostrum. II: effects of heating duration on pathogen viability and immunoglobulin G *J. Dairy Sci., Elsevier*, 2006, 89, 3476-3483.

González, J. B., Soto, Z., Hernández, E., Villareal, J., et al. (2013). Aislamiento de salmonella spp y herramientas moleculares para su detección. *Revista Científica Salud Uninorte*, 30(1).

Guthrie, R., Brunson, K., and Stiles, J. (1968). A selective-differential medium for detection of *streptococcus agalactiae*. *Canadian journal of comparative medicine and veterinary science*, 32(1):366.

Kahla, I. B., Boschioli, M., Souissi, F., Cherif, N., Benzarti, M., Boukadida, J., and Ham- mami, S. (2011). Isolation and molecular characterisation of *Mycobacterium bovis* from raw milk in tunisia. *African health sciences*, 11(3):2-5.

Kryzer, A. A., Godden, S. M., & Schell, R. (2015). Heat-treated (in single aliquot or batch) colostrum outperforms non-heat-treated colostrum in terms of quality and transfer of immunoglobulin G in neonatal Jersey calves. *Journal of dairy science*, 98(3), 1870-1877.

McGrath, B. A., Fox, P. F., McSweeney, P. L., and Kelly, A. L. (2016).

Composition and properties of bovine colostrum: a review. *Dairy science & technology*, 96(2):133–158.

Milián Suazo, F.; García Casanova, L.; Romero Torres, C.; Cantó Alarcón, G. J.; Gutiérrez Reyes, J. A.; Gallegos Sosa, S.; Mercado Pezzat, M.; Mejía Estrada, F.; Peña Cisneros, A. L.; Estrada Chávez, C. & others Diversidad genética y distribución regional de cepas de *Mycobacterium bovis* del ganado en México *Revista mexicana de ciencias pecuarias*, **2012**, 3, 459-471.

Mol, J. P.; Pires, S. F.; Chapeaurouge, A. D.; Perales, J.; Santos, R. L.; Andrade, H. M. & Lage, A. P. Proteomic profile of *Brucella abortus*-infected bovine chorioallantoic membrane explants *PLoS One, Public Library of Science*, **2016**, 11, E0154209.

Nugent, G.; Yockney, I. J.; Whitford, J.; Aldwell, F. E. & Buddle, B. M. Efficacy of oral BCG vaccination in protecting free-ranging cattle from natural infection by *Mycobacterium bovis* *Vet. Microbiol., Elsevier*, **2017**, 208, 181-189.

Pandey, N., Dar, A., Mondal, D., and Nagaraja, L. (2011). Bovine colostrum: a veterinary nutraceutical. *Journal of Veterinary Medicine and Animal Health*, 3(3):31–35.

Paolicchi, F.; Morsella, C.; Cipolla, A.; Seguro, R. & González, A. Pasteurización de leche destinada a terneros: efecto sobre la inactivación de *Mycobacterium avium* subsp paratuberculosis *Revista de Medicina Veterinaria Buenos Aires, Sociedad de Medicina Veterinaria República Argentina*, 2007, 88, 117

Parra, M., Durango, J., and Máttar, S. (2002). Microbiología, patogénesis, epidemiología, clínica y diagnóstico de las infecciones producidas por salmonella. *Revista MVZ Córdoba*, 7(2).

Pereyra, E. A., Dallard, B. E., and Calvinho, L. F. (2014). Aspectos de la respuesta inmune innata en las infecciones intramamarias causadas por *Staphylococcus aureus* en bovinos. *Revista argentina de microbiología*, 46(4):363–

375.

Rivera, L., Motta, P., Cerón, M., and Chimonja, F. (2012). Resistencia de la salmonella a los antimicrobianos convencionales para su tratamiento. *Rev CES Med Vet Zootec*, 7(1):116–29.

Romero, E. A. & Álvarez, S. C. Efecto del suministro de calostro fresco o tratado térmicamente en el levante de terneras Zamorano: Escuela Agrícola Panamericana, 2015., 2015.

Saalfeld, M. H., Pereira, D. I. B., Valente, J. d. S. S., Borchardt, J. L., Weissheimer, C. F., Gularte, M. A., and Leite, F. P. L. (2016). Effect of anaerobic bovine colostrum fermentation on bacteria growth inhibition. *Ciência Rural*, 46(12):2152–2157.

Sanogo, M.; Fretin, D.; Thys, E. & Saegerman, C. Exploring the Diversity of Field Strains of *Brucella abortus* Biovar 3 Isolated in West Africa *Front. Microbiol., Frontiers*, **2017**, 8, 1232.

Stabel, J. On-farm batch pasteurization destroys *Mycobacterium paratuberculosis* in waste milk. *J. Dairy Sci., Elsevier*, **2001**, 84, 524-527

Stabel, J.; Hurd, S.; Calvente, L. & Rosenbusch, R. Destruction of *Mycobacterium paratuberculosis*, *Salmonella* spp., and *Mycoplasma* spp. in raw milk by a commercial on farm high-temperature, short-time pasteurizer. *J. Dairy Sci., Elsevier*, **2004**, 87, 2177-2183

Stelwagen, K., Carpenter, E., Haigh, B., Hodgkinson, A., and Wheeler, T. (2009). Immune components of bovine colostrum and milk. *Journal of animal science*, 87(13_suppl):3– 9.

Stewart, S., Godden, S., Bey, R., Rapnicki, P., Fetrow, J., Farnsworth, R., Scanlon, M., Arnold, Y., Clow, L., Mueller, K., et al. (2005). Preventing bacterial contamination and proliferation during the harvest, storage, and feeding of fresh bovine colostrum. *Journal of dairy science*, 88(7):2571–2578.

Tacoma, R and Gelsinger, S L and Lam, Y W and Scuderi, R A and Ebenstein, D B and Heinrichs, A J and Greenwood, S L. Exploration of the bovine colostrum proteome and effects of heat treatment time on colostrum protein profile. *J Dairy Sci*, 2017, 100, 9392-9401.

Walland, J., Lauper, J., Frey, J., Imhof, R., Stephan, R., Seuberlich, T., & Oevermann, A. (2015). "Listeria Monocytogenes" Infection in Ruminants: Is There a Link to the Environment, Food and Human Health?: a Review (Doctoral dissertation, Verlag nicht ermittelbar).

Wolter, W., Castañeda, H., Kloppert, B., and Zschöck, M. (2002). *La mastitis bovina*. Universitätsbibliothek.

Dirección General de Bibliotecas UFR

IX ANEXOS

9.1 Metodología empleada para el cultivo de *M. bovis* en calostro bovino.

Procedimiento de cultivo de leche para la búsqueda de *Mycobacterium bovis*.

La técnica está basada en el método de Petroff Modificado, con adecuaciones por UAQ 2014 y con apoyo de la técnica de Ben Kahla I. et. al. 2011.

1. Esterilizar la campana de bioseguridad con alcohol y con luz UV durante 5 minutos.
2. Activar el flujo de aire de la campana de bioseguridad 5 minutos antes del proceso.
3. 10 ml de Calostro se colocan en un tubo cónico de 50 ml.
4. Como control positivo. 10ml de calostro se coloca en un tubo cónico de 50 ml y se le añade una asada de colonias de *M. bovis* crecidas en medio sólido.
5. Agregar 20 ml de HCl 10%, adicionar 2 gotas de indicador Rojo fenol 1%
6. Homogenizar manualmente y dejar reposar durante 20 minutos.
7. Neutralizar añadiendo gota a gota solución de hidróxido de sodio 2N agitando manualmente hasta que el indicador vire a un color lila- morado.
8. Centrifugar a 3000 rpm durante 20 minutos. Atemperar los medios de cultivos y rotularlos.
9. Desechar por decantado el 90% de sobrenadante a un frasco con fenol al 5% dejando máximo 1 ml de líquido. Suspender el sedimento con vortex.
10. Vaciar por decantado 2 gotas del líquido suspendido al medio de cultivo, a manera de que resbale el líquido por todo el medio de cultivo. Cerrar completamente la tapa del tubo de cultivo sin apretar. Asegurarse que antes de inocular se haya eliminado el agua de condensación.
11. Una vez sembrados los medios de cultivo se almacenan inclinados en la estufa de cultivo a 37°C. Después de 48 horas colocar los tubos de forma vertical.

12. Revisar quincenalmente los cultivos, hasta completar los 3 meses.

9.2 Metodología modificada para el cultivo de *M. bovis* en calostro bovino.

Procedimiento de cultivo de Calostro en polvo para la búsqueda de *Mycobacterium bovis*.

La técnica está basada en el método de Petroff Modificado, con adecuaciones por UAQ 2014 y con apoyo de la técnica de Ben Kahla I. et. al. 2011

1. Esterilizar la campana de bioseguridad con alcohol y con luz UV durante 5 minutos.
2. Activar el flujo de aire de la campana de bioseguridad 5 minutos antes del proceso.
3. Tomar 5 gramos de calostro en polvo se disuelven en 50 ml de agua destilada estéril precalentada a 50°C y homogeneizar. Tomar 6 tubos y añadir 2 ml de calostro homogeneizado en cada uno y organizar los tubos de la siguiente manera:
 - Tomar 3 tubos y añadir 500µl de agua destilada estéril
 - Tomar 3 tubos y añadir 500µl de glicobacteria.
4. Adicional se colocan 16 tubos de la siguiente forma:
 - Tomar 3 tubos, colocar 2ml de calostro obtenido de una unidad de producción y se le añaden 500µl de agua.
 - Tomar 3 tubos, colocar 2ml de calostro obtenido de una unidad de producción y añadir 500µl de glicobacterias.
 - Tomar 3 tubos, colocar 2 ml de agua destilada estéril y añadir 500µl de glicobacterias.
 - Tomar 3 tubos, colocar 2.5 ml de agua destilada estéril.
5. Centrifugar los tubos a 4000 rpm durante 5 minutos.
6. Tomar 1ml del precipitado y transferir a un nuevo tubo cónico.
7. Agregar al precipitado ml de HCl 10%, adicionar 2 gotas de indicador Rojo fenol 1%
8. Homogenizar manualmente y dejar reposar durante 20 minutos.
9. Neutralizar añadiendo gota a gota solución de hidróxido de sodio 2N agitando manualmente hasta que el indicador vire a un color lila- morado.

10. Centrifugar a 3000 rpm durante 20 minutos. Atemperar los medios de cultivos y rotularlos.
11. Desechar por decantado el 90% de sobrenadante a un frasco con fenol al 5% dejando máximo 0.5 ml de líquido. Suspende el sedimento con vortex.
12. Vaciar por decantado 2 gotas del líquido suspendido al medio de cultivo, a manera de que resbale el líquido por todo el medio de cultivo. Cerrar completamente la tapa del tubo de cultivo sin apretar. Asegurarse que antes de inocular se haya eliminado el agua de condensación.
13. Una vez sembrados los medios de cultivo se almacenan inclinados en la estufa de cultivo a 37°C. Después de 48 horas colocar los tubos de forma vertical.
14. Revisar quincenalmente los cultivos, hasta completar los 3 meses.

9.3 Metodología empleada en la extracción de DNA de calostro.

1. Se toma una muestra de 1ml de calostro bovino, se agregan 50 μ l de Lisozima (10 mg/ml), agitar las muestras en un vortex por 8 segundos e incubar a 37 °C durante 1hora.
2. Se añaden 100 μ l de SDS 10% seguido por 10 μ l de una solución de proteinasa K (10 mg/ml).
3. Incubar en baño maría a 65°C \pm 2°C durante 30 minutos, después de la incubación, a cada muestra se le agregan 100 μ l de 5M NaCl y agitar en vortex.
4. Agregar 40 μ l de N-acetil-N,N,N- bromuro de trimetil amonio (CTAB) al 10% (Pre- incubado) agitar en vortex hasta que la solución se torne lechosa e incubar a 65°C durante 30 minutos.
5. Se agregan 400 μ l de una solución de fenol-cloroformo-isoamilico (24:24:1), se agita por 10 segundos en vortex y se centrifuga a 13,000 rpm durante 10 minutos.
6. Se toman 500 μ l del sobrenadante y se transfieren a un tubo ependorf de 1.5 ml.
7. Se agregan 500 μ l de una solución de cloroformo-isoamilico (24:1) agitando en vortex por 10 segundos y se centrifuga a 13,000 rpm por 10 minutos.
8. Se toman 500 μ l de líquido sobrenadante cuidando de no tocar la otra fase y se transfieren a un tubo ependorf de 1.5 ml.
9. Se agregan 600 μ l de una solución de alcohol isopropilico absoluto y se deja precipitando la pastilla de DNA a -20 °C por 2 horas.
10. Se centrifuga el producto a 13,000 rpm durante 15 minutos.
11. Se retira el líquido sobrenadante y se lava la pastilla de DNA con 500 μ l de etanol al 70%. Centrifugar a 13,000 rpm por 5 minutos.
12. Eliminar el líquido sobrenadante y se permite el secado de la pastilla a temperatura ambiente por 2 horas.
13. Suspender la pastilla el 50 μ l de agua (MILI-Q) y mantener la congelación hasta su utilización.

9.4 Consideraciones para el uso de sistemas comerciales de pasterización.

Hay varios requisitos y problemas importantes que los productores deberían conocer antes de comprar, instalar y usar sistemas de pasterización:

Requerimientos de instalación:

1. ¿Se cuenta con calentador de agua?, ¿Se necesita un nuevo calentador autónomo en la unidad de producción?, ¿Funciona el calentador de agua existente? (es decir, ¿el agua es lo suficientemente caliente?).

Suministro de agua:

2. c) ¿Existen requisitos eléctricos especiales?
3. d) Espacio / ubicación
4. e) Requisitos de drenaje.
5. f) Gastos de compra e instalación.

Consideraciones para el uso diario:

1. Capacitar al personal de la granja para usar y limpiar adecuadamente el equipo
2. Tiempo / mano de obra para usar y limpiar equipos
3. Requisitos de limpieza.

Costes variables:

1. Servicio. ¿El equipo es confiable? ¿Qué tan rápido se puede proporcionar el servicio?
2. Traslado y almacenamiento de la leche residual antes y después de la pasteurización.
3. Seguimiento del rendimiento. ¿Está funcionando?

9.5 Procedimiento adecuado de limpieza de los equipos:

Un proceso de limpieza es como sigue:

1. Enjuague previo con agua fría.
2. Haga circular el enjuague con detergente alcalino para eliminar la grasa (1% en peso / volumen de NaOH – 75°C / 30min).
3. Enjuague con agua caliente (75 °C / 15 min).
4. Haga circular el enjuague con ácido nítrico para eliminar la proteína (0.7% p/vol - 70 °C / 15 min).
5. Enjuague posterior con agua caliente (75 °C / 15 min).

9.6 Resultados del cultivo de *Mycobacterium avium*.

Cultivo Bacteriológico de Paratuberculosis

Las muestras se descontaminaron por el método ácido álcali, y se sembraron por duplicado en el medio de cultivo herrold egg yolk con micobactina y sin micobactina, se incubaron a 37 grados.

CALOSTRO

FELICIANO M.

QUERÉTARO

Fecha de siembra: 15-FEBRERO-2018.

	IDENTIFICACIÓN	RESULTADOS AL 15-06-2018 (17 SEMANAS)
1.	4485 A	SIN CRECIMIENTO (SC)
2.	44960	SC
3.	4585 A	SC
4.	4535 A	+++ Map**
5.	4567 A	SC
6.	4546 A	+++ Map
7.	4537 A	SC
8.	4502 A	SC
9.	4543 A	SC
10.	4488 B	SC
11.	4591 A	SC
12.	4409 A	SC
13.	4582 B	SC
14.	4595 A	SC
15.	4529 A	+++Map
16.	4493 A	SC
17.	4477 A	SC
18.	4570 A	SC
19.	4492 A	SC
20.	4482 B	SC
21.	4479 B	+++Map
22.	4491 A	SC
23.	4555 A	SC
24.	4549 A	SC
25.	4573 A	SC
26.	4539 A	SC
27.	4561 A	SC
28.	4523 A	+++Map
29.	4552 A	SC
30.	4558 A	+++ Map
31.	4505 A	+++Map

1.	4478 A	SC
2.	4532 A	SC
3.	4588 A	SC
4.	4508 A	SC
5.	4579 A	SC
6.	4564 A	SC
7.	4576 A	+++ Map
8.	4517 A	+++ Map
9.	4520 A	SC
10.	4514 A	SC
11.	4541 A	SC
12.	4526 B	SC
13.	4511 A	SC

**** SE CONSIDERA AISLAMIENTO POSITIVO A Map, POR SU VELOCIDAD DE CRECIMIENTO 4 SEMANAS EN ADELANTE, CRECIMIENTO EN EL MEDIO CON MICOBACTINA Y ZN+ (BAAR).**

LOS AISLA DOS OBTENIDOS SE DESARROLLARON ENTRE LA 4 Y 6 SEMANA, SOLO EN LOS MEDIOS DE CULTIVO QUE ESTABAN ENRIQUECIDOS CON MICOBACTINA.

**MC. MARCO ANTONIO SANTILLAN FLORES
LAB. TUBERCULOSIS BOVINA
CENID MICROBIOLOGIA INIFAP**

9.7 Resultados del cultivo de *Brucella abortus*.



CENTRO NACIONAL DE INVESTIGACION DISCIPLINARIA EN MICROBIOLOGIA ANIMAL

Ciudad de México, marzo 23 del 2018

Dr. Feliciano Milián Suazo
Universidad Autónoma de Querétaro
PRESENTE.

Estimado Dr. Milián,

Sírvase encontrar anexo el resultado de laboratorio de las muestras de calostro enviadas para análisis de laboratorio para la identificación de *Brucella abortus*.

Sin más, aprovecho para enviarle un cordial saludo.

Atentamente

Dr. Efrén Díaz Aparicio
CENID-Microbiología, INIFAP

**CENTRO NACIONAL DE INVESTIGACION DISCIPLINARIA
 EN MICROBIOLOGIA ANIMAL**

Fecha: 23 de marzo del 2018

Resultado del análisis microbiológico en placas de Farrel para realizar el aislamiento y la identificación de *Brucella abortus* en muestras de calostro enviadas por el Dr. Feliciano Milián Suazo de la Universidad Autónoma de Querétaro.

Número de muestra	Resultado
4477	Negativo
4478	Negativo
479	Negativo
4482	Negativo
4483	Negativo
4488	Negativo
4491	Negativo
4492	Negativo
4493	Negativo
4496	Negativo
4499	Negativo
4502	Negativo
4503	Negativo
4508	Negativo
4511	Negativo
4514	Negativo
4517	Negativo
4520	Negativo
4523	Negativo
4526	Negativo
4529	Negativo
4532	Negativo
4535	Negativo
4537	Negativo
4539	Negativo
4541	Negativo
4543	Negativo
4546	Negativo
4549	Negativo
4552	Negativo
4555	Negativo
4558	Negativo
4561	Negativo
4564	Negativo
4567	Negativo
4570	Negativo
4573	Negativo
4576	Negativo
4579	Negativo
4582	Negativo
4585	Negativo
4588	Negativo
4591	Negativo
4594	Negativo