



Maestría Interinstitucional en Producción Pecuaria (MIPPE)

Tesis

EFFECTO DE TRATAMIENTO TÉRMICO EN CAMPO AL CALOSTRO BOVINO SOBRE LA CONCENTRACIÓN DE INMUNOGLOBULINAS, LA FALLA DE TRANSFERENCIA DE INMUNIDAD PASIVA Y LA CONTAMINACIÓN BACTERIANA.

Presenta

MVZ JORGE EDUARDO PONCE HERNÁNDEZ

Para obtener el grado de

MAESTRO EN PRODUCCIÓN PECUARIA

Comité Tutorial

DR. ARTURO GERARDO VALDIVIA FLORES (TUTOR)

DR. ABNER JOSUÉ GUTIÉRREZ CHÁVEZ

DR. FRANCISCO JAVIER PADILLA RAMÍREZ

DR. CARLOS URBAN HAUBI SEGURA

Aguascalientes, Ags., 1 de Octubre de 2017

AUTORIZACIONES



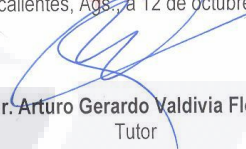
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA
DE AGUASCALIENTES

DR. RAUL ORTIZ MARTINEZ
DECANO DEL CENTRO DE CIENCIAS AGROPECUARIAS
P R E S E N T E.

Por medio del presente como Tutor designado del egresado Jorge Eduardo Ponce Hernández con ID 210177 quien realizó la tesis titulada: **EFFECTO DE TRATAMIENTO TÉRMICO EN CAMPO AL CALOSTRO BOVINO SOBRE LA CONCENTRACIÓN DE INMUNOGLOBULINAS, LA FALLA DE TRANSFERENCIA DE INMUNIDAD PASIVA Y LA CONTAMINACIÓN BACTERIANA** durante sus estudios en la Maestría Interinstitucional en Ciencias Pecuarias y con fundamento en el Artículo 175, Apartado II del Reglamento General de Docencia, me permito emitir el **VOTO APROBATORIO**, para que él pueda proceder a imprimirla, y así como continuar con el procedimiento administrativo para la obtención del grado.

Pongo lo anterior a su digna consideración y sin otro particular por el momento, me permito enviarle un cordial saludo.

ATENTAMENTE
"Se Lumen Proferre"
Aguascalientes, Ags., a 12 de octubre de 2017


Dr. Arturo Gerardo Valdivia Flores
Tutor

c.c.p. Alumno

RECONOCIMIENTOS

Agradezco a mi familia, especialmente a mi esposa Ana Sofía Martínez Topete, a mis hijos Ana Sofía, Adriana y Jorge Eduardo por todo el apoyo, esfuerzo, ayuda y paciencia para el desarrollo de la tesis de maestría, así como al Dr. Arturo Gerardo Valdivia Flores, quien asesoró el proyecto desde la concepción de la idea y acompañamiento.

Al comité Tutorial, Dr. Arturo Gerardo Valdivia Flores, Dr. Abner Josué Gutiérrez Chávez, Dr. Francisco Javier Padilla Ramírez, Dr. Carlos Urban Haubi Segura, por la invaluable asesoría, consejos, ayuda, regaños, exigencias, tiempo y trabajo para la ejecución, el análisis teórico y hasta la redacción definitiva del presente documento.

Al Decano del Centro Agropecuario Dr. Raúl Ortiz Martínez, a todos los maestros que me ayudaron Dr. Teódulo Quezada Tristán, Dra. Carolina de Luna, Dra. Leticia Chávez, Dra. Erica Rangel, a la Universidad Autónoma de Aguascalientes por todas las facilidades y enseñanzas.

Así como el Dr. Manuel Campos, Dr. Manuel Chamorro, Michael Chubb, Deborah Haines y Eros Milanez por el apoyo, ayuda, consejos y amistad.

A la empresa Saskatoon Colostrum LTD, Alta Genetics y Grupo Koepon, por apoyo y soporte.

ÍNDICE GENERAL

AUTORIZACIONES	2
RECONOCIMIENTOS.....	3
ACRÓNIMOS	8
RESUMEN	9
ABSTRACT	10
INTRODUCCIÓN	11
1. ESTRUCTURA DEL TRABAJO.....	18
2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	21
2.1. ORIGEN, EVOLUCIÓN Y ESTADO ACTUAL DEL PROBLEMA	21
2.2. CONDICIONES LOCALES QUE PERMITEN ABORDAR EL PROBLEMA	24
2.3. HIPÓTESIS DE INVESTIGACIÓN	25
2.4. OBJETIVOS.....	25
2.4.1. Objetivo general.....	25
2.4.2. Objetivos específicos.....	25
2.5. JUSTIFICACIÓN	26
2.5.1. Importancia del estudio.....	26
2.5.2. Importancia en el ámbito científico.....	26
2.5.3. Importancia en las tecnologías de producción	27
2.5.4. Importancia social.....	27
2.5.5. Importancia económica.....	27
2.5.6. Importancia ambiental.....	28
3. MARCO TEÓRICO.....	29
3.1. ORIGEN DEL CALOSTRO BOVINO	29
3.2. INMUNOGLOBULINAS MATERNAS.....	31
3.3. TRANSFERENCIA DE INMUNIDAD PASIVA.....	32
3.4. ABSORCIÓN Y TRANSPORTE DE INMUNOGLOBULINAS	33
3.5. FACTORES QUE AFECTAN LA TRANSFERENCIA DE INMUNIDAD PASIVA.....	38
3.6. ENFERMEDADES DE LA BECERRA.....	40
3.7 CALIDAD DE CALOSTRO	42
3.8 TRATAMIENTO TÉRMICO	43
4. MATERIALES Y MÉTODOS.....	48
4.1. UBICACIÓN DEL ESTUDIO.....	48
4.2. POBLACIÓN BAJO ESTUDIO	48
4.3. TOMA DE MUESTRAS	50
4.4. EVALUACIÓN DE LA CONSERVACION DE LA CONCENTRACION DE INMUNOGLOBULINAS:	51
4.4.1. Refractometría	51
4.4.2. Inmunodifusión Radial	52
4.5. ESTIMACIÓN DE FALLA DE TRANSFERENCIA DE INMUNIDAD PASIVA:.....	53
4.6. EVALUACIÓN DE LA CONTAMINACIÓN POR BACTERIAS PATÓGENAS.	53
4.6.1 Caldo Agar Tripticasa	54
4.6.3. Peroxidasa	57
4.6.4. Oxidasa	58
4.6.5. PCR.....	59
4.7. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	59
5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	61

6. CONCLUSIÓN	73
BIBLIOGRAFÍA	74
GLOSARIO.....	81
ANEXOS	85
Anexo A PROPUESTA DE ARTICULO PARA PUBLICAR	86
Anexo B DESCRIPCIÓN DE TÉCNICAS.....	99
Anexo B.1. Fosfatasa alcalina	99
Anexo B.2 Inmunodifusión Radial.....	105
Anexo B.3 Pruebas Bacteriológicas	108
Anexo C CONGRESOS Y PUBLICACIONES.....	122



ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 Becerro al momento del parto mostrando partículas de materia fecal en la lengua sugiriendo una contaminación precoz del recién nacido.....	25
Figura 2 Estructura molecular de las inmunoglobulinas. Panel A. Estructura tridimensional.....	31
Figura 3 Correlación entre la densidad y el valor de grados Brix. Elaboración propia con datos de Campos, 2003.....	34
Figura 4 Identificación básica de bacterias por método de tinción de Gram	42
Figura 5 Pasteurizador de calostro empleados en los ranchos participantes (Dairy Tech 40 L y Pasteurizadores de Aguascalientes 40 L).	45
Figura 6 Almacenamiento de muestras en congelación.	51
Figura 7 Ejemplo de respuesta para prueba Inmunodifusión radial	53
Figura 8 Ejemplo siembra en agar por dispersión celular. Ejemplo de respuesta para prueba cultivo en caldo tripticasa (Fuente propia)	55
Figura 9 Ejemplo siembra en agar por dispersión celular. Ejemplo de respuesta para prueba cultivo en caldo tripticasa (Fuente propia).	55
Figura 10 Ejemplo siembra en agar por dispersión celular (Fuente propia).....	56
Figura 11 Tinción de Gram para identificación de bacterias por observación microscópica (Fuente propia).....	57
Figura 12 Fotografía de colonias de Brucella con tinción de Gram por observación en microscopio 40X, 100X, de izquierda a derecha respectivamente (Fuente propia).....	57
Figura 13 Ejemplo prueba Catalasa positiva Gram –	58
Figura 14. Grafica para Estimación de la concentración de inmunoglobulinas mediante refractometría en (grados Brix) e inmunodifusión radial (g/L) en calostro bovino fresco, tratado y suministrado.	62
Figura 15 Concentración sérica estimada de Inmunoglobulinas en becerras 48 horas postconsumo de calostro en dos establos (g/100 mL)	65
Figura 16 Número de muestras positivas a Brucella (BR) en calostro Fresco, Tratado y Suministrado.	69
Figura 17 Cultivo agar Brucella, muestra 76 crecimiento colonias (Fuente propia	70
Figura 18 Fotografía 2 de colonias de Brucella con tinción de Gram por observación en microscopio compuesto y confirmación por PCR (Fuente propia).	70

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1 Producción de leche por estados en México 15

Tabla 2 Tratamiento térmico y recuperación de Mycoplasma bovis, Escherichia coli O157:H7, Salmonella enteritidis, Listeria monocytogenes y Mycobacterium avium (Map). 23

Tabla 3 Variación de la composición química del calostro según número de ordeños de calostro . 29

Tabla 4 Factores de riesgo para transferencia de inmunidad pasiva e inocuidad..... 35

Tabla 5 Comparación de parámetros productivos por rancho durante el estudio (feb-ago. 2016). . 49

Tabla 6 Análisis Estadístico 59

Tabla 7 Estimación de la concentración de inmunoglobulinas mediante refractometría en (grados Brix) e inmunodifusión radial (g/L) en calostro bovino fresco, tratado y suministrado. 61

Tabla 8 Estimación de la absorción para transferencia de inmunidad pasiva por refractometría de proteína total en suero de sangre a 48 h por rancho (g/100 mL). 63

Tabla 9 Estimación de la absorción para transferencia de inmunidad pasiva por refractometría de proteína total en suero de sangre a 48 h por rancho (g/100 mL). 64

Tabla 10 Diarrea en periodo de lactante en becerras por rancho (%) (periodo lactante 60 días).... 66

Tabla 11 Mortalidad en periodo de lactante en becerras por rancho (%) en el periodo de 6 meses del estudio). 67

Tabla 12 Cambio en la prevalencia (P) de microorganismos patógenos detectada en muestras de calostro fresco, tratado y suministrado. 69

ACRÓNIMOS

ANDEVA	Análisis de varianza	n	Número de observaciones
ANOVA	Analysis of Variance	N	Solución Normal
ARN	Ácido ribonucleico	N.D.	Dato no disponible
°Bx	Grados Brix	ng	Nanogramo
BR	Brucelosis	nm	Nanómetro
CF	Calostro Fresco		
CTT	Calostro con Tratamiento térmico		
CS	Calostro al suministro		
dL	Decilitro	NOM	Norma Oficial Mexicana
E.E.	Error estándar	°C	Grados Celsius
ELISA	Ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas	P	Probabilidad de "F" en ANDEVA
et al.,	Y colaboradores	w/v	weight/volumen (peso por volumen)
FA	Fosfatasa alcalina	P.V.	Peso vivo
FTIP	Falla de transferencia de Inmunidad Pasiva	PCR	Reacción en cadena de la Polimerasa
FPIT	Failfure Passive Immunity Transfer	pH	Potencial de Hidrógeno
FAO	Food and Agriculture Organization	psi	Libras por pulgada cuadrada
g	Gramos	PIT	Passive Immunity Transfer
g	Gravedades	RID	Radial Immune Diffusion
GLM	Modelo lineal general	rpm	Revoluciones por minuto
HT	Heat Treatment	s	Segundo
h	Hora	SAS	Statistical Analysis System
IDRg	Inmunodifusión Radial	sem	Semana
Ig's	Inmunoglobulinas	SIAP	Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera
IgG	Inmunoglobulina G	t^{1/2}	Tiempo de vida media
IgG1	Inmunoglobulina G 1	TLC	Cromatografía en capa fina
IgG2	Inmunoglobulina G 2	TP	Transferencia de Inmunidad Pasiva
IgA	Inmunoglobulina A	TT	Tratamiento Térmico
IgM	Inmunoglobulina M	U/L	Unidades por litro
kg	Kilogramo	µg	Microgramo
L	Litro	µL	Microlitro
Map	<i>Mycobacterium avium paratuberculosis</i>	µmol	Micromol
mL	Mililitro		
mm	Milímetro		
mV	Milivolt		

RESUMEN

Ponce Hernández J. E., Valdivia Flores A. G., Gutiérrez Chávez A. J., Padilla Ramírez F. J. y Haubi Segura C.U.

Diversas enfermedades de los bovinos son transmitidas por el calostro, por lo que en establos tecnificados se ha popularizado el uso de su tratamiento térmico (TT) mediante diferentes protocolos de tiempo y temperatura recomendados por los fabricantes de equipos; sin embargo, la prevalencia de enfermedades transmitidas en el calostro no siempre disminuye, por lo que los productores tienen dudas de su verdadera eficacia en campo. El objetivo fue evaluar en condiciones de campo la eficacia del TT para conservar la concentración de inmunoglobulinas (Ig's) maternas, permitir la transferencia de inmunidad pasiva (TP) y disminuir la contaminación por bacterias patógenas. Se seleccionaron por el método no probabilístico de conveniencia dos explotaciones lecheras tecnificadas con hatos grandes (>1000 vacas), ubicadas en el Altiplano Central Mexicano, que practicaban TT de forma rutinaria con equipo similar. Durante un periodo de seis meses se obtuvieron aleatoriamente 336 muestras de calostro fresco (CF), calostro con tratamiento térmico (CTT) y calostro en el momento de ser suministrado (CS) Se congelaron las muestras en viales de plástico (50 mL) identificados y se determinó la presencia de microorganismos, mediante cultivo, aislamiento e identificación microscópica y molecular; se estimó la concentración de Ig's por refractometría e inmunodifusión radial. Se estimó la TP mediante la concentración de proteínas séricas de los becerros alimentados con calostro, 48 h después de la primera alimentación. Se confirmó *in vitro* que el TT tuvo la capacidad de preservar las Ig's y de disminuir la contaminación bacteriana; ya que todos los géneros de *Streptococcus*, *Staphylococcus*, *Brucella*, enterobacterias y levaduras presentes fueron eliminados (60 min 60°C). En condiciones de campo la reducción media de Ig's no fue significativa ($5.0 \pm 3.0\%$) por el TT, ni en relación con el rancho de procedencia de las muestras, mes o etapa de proceso CF, CTT o CS ($P > 0.05$); sin embargo, la cantidad de Ig's séricas se asoció ($P < 0.05$) con el rancho de procedencia, así como con la tasa de morbilidad y mortalidad observada en los becerros neonatos. Se determinó contaminación bacteriana por medio de prueba de turbidez en el medio de cultivo caldo tripticasa soya de las muestras de calostro. Los resultados de esta prueba indican que el riesgo de contaminación de calostro es muy alto independientemente de la etapa de colección: 95% de las muestras de calostro fresco fueron positivas a la prueba de turbidez. También un gran porcentaje, 90% de muestras obtenidas después del tratamiento térmico y al momento de ser suministrado a la becerro resultaron positivas a la prueba de turbidez. Todas las muestras con indicación de crecimiento bacteriano en este cultivo se les dio seguimiento con cultivos sólidos y tinción Gram para la subsecuente identificación de *Brucella*. Resultados de estas pruebas subsecuentes indican que 59 de las 336 muestras obtenidas estaban contaminadas con *Brucella*. 20 de estas muestras provenían de CF, 19 de CTT y 20 de SC. La identidad de 10 muestras aleatorias de este grupo de muestras positivas a *Brucella* fue confirmada molecularmente por PCR. Los resultados obtenidos en este estudio de sondeo indican que el riesgo de contaminación microbiana presente en las muestras del calostro no disminuyó significativamente entre el calostro fresco, tratado térmicamente y hasta el momento de ser suministrado con biberón. Estos resultados sugieren que en condiciones de campo la implementación de prácticas de manejo de tratamiento térmico de calostro bovino para reducir el riesgo de transmisión de *Brucella* de adultos a becerros de remplazo es insuficiente para reducir el riesgo de contaminación en las diferentes etapas de proceso.

Palabras clave: Calostro, Contaminación Bacteriana, Inmunoglobulinas, tratamiento térmico, transferencia pasiva de inmunidad.

ABSTRACT

Ponce Hernández J. E., Valdivia Flores A. G., Gutiérrez Chávez A. J., Padilla Ramírez F. J. y Haubi Segura C.U.

Some diseases of bovine cattle are transmitted by colostrum, therefore, in highly technified dairy farms the use of heat treatment (HT) of colostrum has become popular, using different protocols for time and temperature, mostly recommended by the equipment manufacturers. However, the prevalence of disease transmitted by colostrum does not always decrease considerably and producers have doubts about the true efficacy of heat-treated colostrum (HTC) in the field and of critical risk procedures and sanitary management. The objective of this research project was to undertake a field survey of the effect of HTC for preserved maternal immunoglobulin (Ig's) concentration, passive immunity transfer (PIT) efficiency and pathogenic bacteria contamination. Two progressive dairy farms milking (> 1000 cows) located in the Mexican central highlands, which practiced HT with similar equipment, were selected by the non-probabilistic method of convenience. During a six-month period 336 samples of fresh colostrum (FC), heat-treated (HTC) (60 min 60 ° C) and supplied at feeding time (SFC) were randomly obtained. PIT was estimated by serum protein concentration from HTC-fed calves sampled 48 h post-colostrum intake. Colostrum samples were frozen, identified by plastic vials (50 mL). Ig concentration was determined by refractometry and radial immunodiffusion. *In vitro* HT of colostrum succeeded at conserving Ig's concentration and decrease bacteria contamination; all *Streptococcus*, *Staphylococcus*, *Brucella*, enterobacteria and yeast were eliminated (60 min 60°C). Furthermore, under field conditions Ig's concentration was not significantly reduced by HT (5.0 g/L ± 3.0%, P>0.05 IgG, independently from the origin of the samples (month or farm), nor the treatment (FC, HTC or SFC). However, serum Ig's concentration was associated to farm origin and to morbidity and mortality rates in newborn calves (P<0.05). Bacterial contamination was determined through the turbidity test of colostrum samples in trypticase soy broth. The results of this test indicate that the risk of contamination of colostrum is high regardless of the stage of colostrum collection, as 95% of fresh samples were positive to the turbidity test. Also, a large percentage (90%) of HTC and SC samples were positive to the turbidity test. All samples with traces of bacterial growth in these cultures were followed-up in solid culture and Gram-stained for the subsequent identification of *Brucella*, from which 59 of the 336 samples (17.5%) were contaminated with *Brucella*: 20 samples came from FC, 19 from HTC and 20 from SFC. From these, 10 random samples were confirmed for *Brucella* using PCR. The results obtained in this survey indicate that the use of FC, HTC and SFC did not significantly reduced the risk of microbial contamination. Furthermore, these results suggest that under field conditions the implementation of heat-treated bovine colostrum to minimize the risk of *Brucella* transmission from cows to replacement heifers is insufficient to reduce contamination risk and, even more, allow for the vertical transmission of diseases from cow to calf or of infected calf to contemporary calves.

Key words: Colostrum, bacteria contamination, Ig's, immunoglobulin, heat treatment, passive immunity transfer.

INTRODUCCIÓN

El calostro es la primera secreción de la glándula mamaria de diferentes especies de animales mamíferos; proporciona factores inmunitarios y de crecimiento que garantizan la salud y vitalidad del recién nacido. El manejo adecuado de calostro bovino y el suministro oportuno es prioritario para proveer a las crías de bovino una dosis adecuada de inmunoglobulinas y otros compuestos bioactivos para promover el desarrollo y desempeño rentable de los animales domésticos para producción en conjunto con el manejo zootécnico recomendado y disminuir los índices de morbilidad y mortalidad (Malmuthuge *et al.*, 2015).

Se han implementado algunos métodos para el tratamiento de calostro como el térmico de 60 °C por 60 minutos (Godden *et al.*, 2006), así como el calostro en polvo (Godden *et al.*, 2009), como herramienta para sustituir y suplementar el consumo en crías de bovino, así como en otras especies animales (Donahue *et al.*, 2012). Por lo que en este estudio se pretende realizar la evaluación del tratamiento térmico al calostro en campo para contaminación bacteriana y concentración de inmunoglobulinas, al incrementarse el interés por el mejor uso del calostro y evaluar el conteo bacteriano y la cantidad de inmunoglobulina en el calostro se compara los parámetros antes y después del tratamiento (Godden, *et al.*, 2006).

La variabilidad en la calidad de calostro toma una relevancia particular debido a que el mercado de la carne ha llegado a los niveles de precios históricamente más altos \$ 3.00 dólares americanos por libra en pie en Estados Unidos de América (SAGARPA, 2015), así como por el interés en disminuir los riesgos de transmisión de enfermedades y la morbilidad y mortalidad en crías bovinas en la cadena productiva lechera.

El calostro es la primera secreción de la glándula mamaria de diferentes especies de animales mamíferos; proporciona factores inmunitarios y de crecimiento que garantizan la salud y vitalidad del recién nacido. El manejo adecuado de calostro bovino y el suministro oportuno es prioritario para proveer a las crías de bovino una dosis adecuada de inmunoglobulinas y otros compuestos bioactivos para promover el desarrollo y desempeño rentable de los animales domésticos para producción en conjunto con el manejo zootécnico recomendado y disminuir los índices de morbilidad y mortalidad (Malmuthuge *et al.*, 2015).

La calidad del calostro se ha medido tradicionalmente mediante el calostrómetro para densidad, además del conteo bacteriano, el cual se reduce drásticamente con una pasteurización adecuada; por lo que muchos productores tienen gran confianza en este sistema y no exigen fundamentos de validación, garantías de la calibración de equipos pasteurizadores y el uso adecuado de éstos, ni pruebas bacteriológicas a cada lote que se procesa.

Sin embargo; la ausencia de avance en el control de enfermedades transmitidas por calostro, como brucelosis y tuberculosis, sugiere que la eficacia bacteriológica de la pasteurización aplicada en el establo puede ser muy variable y en muchos casos, francamente inadecuado.

En México, la mortandad en becerras en establos comerciales supera en 10% al reportado como valor promedio 7% en USA, Canadá, mientras que supera en 5% a lo registrado para Europa (Holstein USA, 2014). Esta mortalidad es atribuida a que el manejo de calostro es muy variable, la calidad y almacenamiento no es homogénea, lo que se traduce en parámetros susceptibles a mejorar considerablemente,

La variabilidad en la calidad en el calostro en la región del Altiplano Central Mexicano y los Altos de Jalisco es una condición poco registrada por los productores, ya que la mayoría que cuentan con poca tecnología para la crianza de becerras. En algunos establos usan el calostrómetro para identificar la densidad y toman como referencia sólo este parámetro, aunque existe la posibilidad de registrar la proteína total del calostro en sitio y de manera rápida y simple con una prueba de refractómetro digital para monitorear (grados para la cantidad de proteínas disponibles en el calostro y adsorbidas por la becerria. (Barrington *et al.*, 2002).

En algunos establos se ha iniciado el protocolo de integrar información relevante, desde la identificación del recién nacido, registro de padres, peso al nacer, tipo de parto, condición y sufrimiento fetal, hora de evento, hora de administración de calostro, volumen ingerido y calidad o calificación del calostro (Roth, 2009).

El esfuerzo en mejorar los estándares de crianza de becerras también provoca un costo adicional, por lo que en un cálculo inicial parece disminuir el margen de rentabilidad económica y tiende a evitarse ante las dificultades evidentes que atraviesa la condición del negocio de la leche a nivel local y nacional.

La pérdida de utilidad bruta se agrava por la oferta y demanda de leche fresca al suplir el abasto con leche descremada en polvo extranjera a un precio muy por debajo del

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

mercado y productos alternos de origen distinto al lácteo. Algunos productores exitosos mitigan el efecto de esta competencia desleal al contar con el ingreso adicional derivado de producir vaquillas de remplazo para venta, así como el gran valor de la carne de los machos para cría y engorda como parte integral de la explotación (Roth, 2009).

Derivado del incremento en el número de animales criados en los estables, se incrementa la demanda por calostro y se pone más atención en su calidad, oportunidad de suministro y en los procedimientos de pasteurización del calostro. De tal forma que el tratamiento térmico del calostro bovino se está volviendo una herramienta general y efectiva en el incremento de rentabilidad de las explotaciones y la disminución de los costos por tratamiento, mortandad y desecho, así como la mejoría en la capacidad de expresión genética del ganado (Gelsinger *et al.*, 2015).

El contexto mundial de la producción ganadera en la lechería y la carne ha modificado el comportamiento de los mercados, presionando la rentabilidad al globalizar el comercio de productos a la mayoría de países, tanto productores como consumidores, generando el intercambio de materia prima, así como productos especializados entre todos los actores; lo que beneficia a algunos desarrollados y presiona la rentabilidad de producción en países deficitarios como México. En estos países donde el balance entre producción y consumo se sule por la importación, se ha establecido una brecha entre sistemas de producción tradicional y tecnificada, en la que el sistema productivo especializado tiene la mayor aportación de producto, pero también mayores costos que el sistema de pastoreo. Debido a la globalización de la economía agropecuaria mexicana, la producción lechera de países que tienen excedentes lecheros y costos inferiores compite con la producción local. El riesgo de quiebra económica de la lechería mexicana sólo tiene como expectativa estratégica realizar acciones que tiendan a mejorar e incrementar la rentabilidad de la producción de leche y carne bovinas. En este contexto, el calostro ha sido identificado como una herramienta eficaz para mejorar e incrementar la rentabilidad económica por medio del alcance de objetivos de crianza y salud de reemplazos. En México la perspectiva del negocio de la leche ha sido incierta y cambiante, el mercado y los precios internacionales determinan el avance o retroceso de la rentabilidad de la actividad, así como el agravante de las políticas públicas de los gobiernos federal y estatales que en vez de desarrollar una política de producción y autosuficiencia alimentaria, estimulan la importación de productos muy baratos e inclusive con precio dumping, para limitar el crecimiento inflacionario general y provoca colapso para la industria lechera, así como la polarización de sistemas

productivos generando una gran presión para los productores medianos que tienden a abandonar la actividad lechera con facilidad.

El entorno económico ha beneficiado la economía de escalas, generando el crecimiento de los establos grandes (>250 vacas en ordeña), que cada vez son más grandes y, por otro lado, los establos muy pequeños productores (<20 vacas en ordeña), de economía familiar y crecimiento limitado; por lo que la transferencia de tecnología se ve limitada de la misma forma, obstaculizando el avance homologado en toda la cadena productiva; sin embargo, todos los productores progresistas demandan herramientas tecnológicas para hacer más eficiente el proceso de producción, optimizar los recursos para ser más eficientes y lograr la mayor rentabilidad y bienestar para sus familias (Romo *et al.*, 2014).

Algunas enfermedades infecciosas de los bovinos como brucelosis y tuberculosis han incrementado su incidencia y prevalencia en las cuencas lecheras mexicanas, además de la emergencia de otras enfermedades relativamente nuevas como la paratuberculosis, diarrea viral bovina y rinotraqueitis infecciosa (Herrera *et al.*, 2010). Todo lo cual indica la ocurrencia de un fracaso de las campañas nacionales de control y erradicación por parte del gobierno, sin una estrategia clara y rentable. Todo ello ha generado la demanda de acciones y herramientas tecnológicas viables para que los productores implementan el control y la satisfacción de las exigencias de las plantas procesadoras que compran el producto es una preocupación real para los propietarios y responsables de los establos, así como para todos los trabajadores y prestadores de servicios, ya que genera pérdidas importantes que ponen en riesgo la estabilidad y persistencia de la actividad lechera.

En el Altiplano Central Mexicano se agudiza la problemática por la situación especial que presenta la región al manejarse los precios más bajos de la República, además de contar con diferentes sistemas de producción predominando los establos medianos.

Tabla 1 Producción de leche por estados en México

Estado	Producción (miles de litros)	Porcentaje de participación	Precio (pesos por litro)	Valor de la producción (miles de pesos)	Superficie (km ²)	Producción (miles de litros/km ²)
Aguascalientes	372,252	3.47	5.48	2,038,515	5,471	68.04
Tlaxcala	109,978	1.03	4.20	462,266	3,997	27.52
Guanajuato	784,770	7.32	4.67	3,663,253	30,607	25.64
Jalisco	1,991,577	18.57	4.63	9,217,110	78,588	25.34
México	482,082	4.50	5.85	2,818,976	22,351	21.57
Hidalgo	398,540	3.72	4.67	1,861,814	20,813	19.15
Querétaro	195,147	1.82	4.84	943,678	11,699	16.68
Puebla	404,132	3.77	5.27	2,128,674	34,306	11.78
Veracruz	723,106	6.74	4.98	3,600,983	71,826	10.07
Distrito Federal	13,784	0.13	8.92	122,989	1,495	9.22
Coahuila	1,275,065	11.89	4.94	6,301,657	151,595	8.41
Durango	997,155	9.30	5.03	5,018,326	123,317	8.09
Colima	36,059	0.34	8.45	304,721	5,616	6.42
Michoacán	339,389	3.16	4.91	1,666,405	58,599	5.79
Chiapas	402,583	3.75	4.26	1,712,987	73,311	5.49
Morelos	20,890	0.19	4.85	101,237	4,879	4.28
Tabasco	101,522	0.95	3.91	396,987	24,731	4.11
Chihuahua	930,020	8.67	4.86	4,515,255	247,460	3.76
Baja California	181,190	1.69	4.92	891,214	73,909	2.45
Zacatecas	172,867	1.61	4.75	821,089	75,284	2.30
Nayarit	60,104	0.56	5.06	304,331	27,857	2.16
San Luis Potosí	128,772	1.20	5.02	646,344	61,137	2.11
Sinaloa	105,875	0.99	4.91	519,417	57,365	1.85
Oaxaca	147,933	1.38	5.87	868,943	93,757	1.58
Guerrero	83,764	0.78	6.85	573,650	63,596	1.32
Campeche	36,364	0.34	6.86	249,586	57,507	0.63
Sonora	112,055	1.04	5.5	616,365	179,355	0.62
Nuevo León	37,790	0.35	4.41	166,564	64,156	0.59
Baja Cal. Norte	41,144	0.38	6.94	285,377	71,450	0.58
Tamaulipas	29,666	0.28	5.62	166,791	80,249	0.37
Quintana Roo	5,562	0.05	4.89	27,188	44,705	0.12
Yucatán	3,153	0.03	5.36	16,912	39,524	0.08
Nacional	10,724,288	100.00	4.94	53,029,602	1,960,512	

Fuente: Elaboración propia con datos de SIAP y SAGARPA 2016.

Los establos grandes son los que mejor desempeño presentan y menores costos de producción, accediendo con más facilidad a el uso de tecnología y en especial de tratamiento y mejora de la calidad del calostro que les permite criar más eficientemente a las becerras y ahora también machos incrementando la rentabilidad de estos. Se han encontrado datos en establos que tienen alta prevalencia de enfermedades la posibilidad de suponer que existe transmisión de enfermedades de la vaca a la becerria aun con tratamiento térmico al calostro y siguen presentando casos e incidencia de brucelosis y tuberculosis en ganado joven y adulto, lo que presupone variabilidad en la calidad del proceso y la eficacia para cierto tipo de bacterias. Por lo que es de interés de esta tesis evaluar el efecto del tratamiento térmico (TT) al calostro bovino empleado en diferentes establos que presenta variaciones significativas en la eficacia para eliminar la contaminación por bacterias patógenas, conservar la concentración de inmunoglobulinas y en la transferencia de inmunidad pasiva a las becerras para estandarizar los procesos y generar eficacia y certeza en el procedimiento y disminuir la prevalencia de enfermedades en la vida de las vacas.

Para evaluar los efectos del tratamiento térmico al calostro en contaminación bacteriana y la concentración de inmunoglobulinas.

El uso de pasteurización para el tratamiento térmico al calostro se ha generalizado con diferentes protocolos de tiempo y temperatura que han recomendado los fabricantes de equipos con poca seriedad al no presentar estudios que demuestren la eficacia de este el único protocolo serio que se recomienda es el de 60 min a 60°C (Godden *et al.*, 2006), sin embargo la prevalencia de enfermedades no ha disminuido en los ranchos en los años de uso del calostro tratado (Donahue *et al.*, 2012), se menciona que el protocolo no es seguro para eliminar el agente causal de la Paratuberculosis bovina (*Mycobacterium avium paratuberculosis*, Map) en las becerras que recibieron calostro tratado después de seguimiento por algunos años (Godden *et al.*, 2015).

En México no se ha hecho un estudio en campo para evaluar el tratamiento térmico al calostro por lo que la investigación demuestre la disminución en contaminación bacteriana y la conservación de la concentración de inmunoglobulinas en el calostro, observar la variabilidad de procesos al tomar muestras de calostro fresco, tratado y suministrado para evaluar el efecto del tratamiento térmico.

Los resultados que se esperan para esta tesis se centran en dilucidar el efecto asociado al rancho de procedencia, donde se aplica el tratamiento térmico al calostro, en la conservación la concentración de Ig's, evitar la falla de transferencia de inmunidad pasiva y contrarrestar la contaminación por microorganismos patógenos. Sin embargo, la cadena de factores de riesgo de cada rancho puede afectar las variables de respuesta.

El crecimiento óptimo y rentable de recría de bovinos tanto para leche o carne es indispensable para asegurar ingresos suficientes para garantizar la producción pecuaria para alimentación tanto local, regional y mundial de alimentos sanos y nutritivos (Roth, 2009).



1. ESTRUCTURA DEL TRABAJO

La estructura de esta tesis se organiza de acuerdo con los lineamientos y Procedimientos institucionales vigentes¹ establecidos para la para la elaboración de tesis o trabajo práctico para la obtención de grado los estudios de nivel posgrado en la UAA. El sistema de citas es el recomendado por la Revista Investigación y Ciencia, El documento inicia con una introducción que presenta y contextualiza el proyecto bajo estudio.

En el capítulo 2 se incluye el planteamiento del problema en el marco de una revisión de los principales estudios previos relevantes para la construcción y delimitación del objeto de estudio. Derivadas de los planteamientos anteriores, se presentan las hipótesis, las preguntas de investigación y los objetivos que guían el estudio. También se integra una justificación que destaca la relevancia e importancia que representa el estudio dentro del Sistema Agropecuario Nacional. Diversas enfermedades de los bovinos son transmitidas por el calostro, por lo que en establos tecnificados se ha popularizado el uso de su tratamiento térmico (TT) mediante diferentes protocolos de tiempo y temperatura recomendados por los fabricantes de equipos; sin embargo, la prevalencia de enfermedades transmitidas en el calostro no siempre disminuye, por lo que los productores tienen dudas de su verdadera eficacia en campo.

En el capítulo 3, Marco Teórico, se presentan las aportaciones de diversos autores para la construcción del objeto de estudio, desde las perspectivas teóricas y prácticas. El objetivo fue evaluar en condiciones de campo la eficacia del TT para conservar la concentración de inmunoglobulinas (Ig's) maternas, permitir la transferencia de inmunidad pasiva (TP) y disminuir la contaminación por bacterias patógenas, ya que otros estudios en México solo han sido realizados en laboratorio.

En el capítulo 4, Materiales y Métodos, se presenta el diseño de investigación empleado, así como las técnicas, instrumentos, formas de recolección de los datos y tipo de análisis de la información, que permitieron la integración analítica y metodológica requerida.

¹Universidad Autónoma de Aguascalientes (2011). *Manual de Lineamientos y Procedimientos de Posgrado para la elaboración de Tesis o Trabajo Práctico para la obtención de grado*. Dirección General de Investigación y Posgrado. Departamento de Apoyo al Posgrado Código. Sistema de Gestión de la Calidad de la UAA: DI-040200-29, Revisión: 00, Emisión: 21/02/11. 27 pp. Consultado en mayo 2014: <https://docsgc.uaa.mx/archivosuser/archivos.php>

Se seleccionaron por el método no probabilístico de conveniencia dos explotaciones lecheras tecnificadas con hatos grandes (>1000 vacas), ubicadas en el Altiplano Central Mexicano, que practicaban TT de forma rutinaria con equipo similar. Durante un periodo de seis meses se obtuvieron aleatoriamente 336 muestras de calostro fresco CF, con tratamiento térmico CTT y en el momento de ser suministrado CS. Se congelaron las muestras en viales de plástico (50 mL) identificados y se determinó la presencia de microorganismos, mediante cultivo, aislamiento e identificación microscópica y molecular; se estimó la concentración de Ig's por refractometría e inmunodifusión radial. Se estimó la TP mediante la concentración de proteínas séricas de los becerros alimentados con calostro, 48 h después de la primera alimentación. Se confirmó *in vitro* que el TT tuvo la capacidad de preservar las Ig's y de disminuir la contaminación bacteriana; ya que todos los géneros de *Streptococcus*, *Staphylococcus*, *Brucella*, enterobacterias y levaduras presentes fueron eliminados (60 min 60°C).

En el capítulo 5, Resultados y Discusión, se presenta una caracterización de los resultados que se obtuvieron los parámetros de comportamiento de acuerdo con los tratamientos y factores incorporados en el estudio, en las magnitudes y proporciones que refieren estudios comparables. Se integra la Discusión en este capítulo porque la interpretación de los resultados se enriquece al integrar investigaciones comparables para expresar una reflexión acerca del significado estudios y resultados similares o antagónicos para entender las diferencias y el valor de los resultados de forma práctica, clara y sustentada. En condiciones de campo la reducción media de Ig's no fue significativa ($5.0 \pm 3.0\%$) por el TT, ni en relación con el rancho de procedencia de las muestras, mes o etapa de proceso CF, CTT o CS ($P > 0.05$); sin embargo, la cantidad de Ig's séricas se asoció ($P < 0.05$) con el rancho de procedencia, así como con la tasa de morbilidad y mortalidad observada en los becerros neonatos. Se determinó contaminación bacteriana por medio de prueba de turbidez en el medio de cultivo caldo tripticasa soya de las muestras de calostro. Los resultados de esta prueba indican que el riesgo de contaminación de calostro es muy alto independientemente de la etapa de colección: 95% de las muestras de calostro fresco fueron positivas a la prueba de turbidez. También un gran porcentaje, 90% de muestras obtenidas después del tratamiento térmico y al momento de ser suministrado a la becerro resultaron positivas a la prueba de turbidez. Todas las muestras con indicación de crecimiento bacteriano en este cultivo se les dio seguimiento con cultivos sólidos y tinción

Gram para la subsecuente identificación de *Brucella*. Resultados de estas pruebas subsecuentes indican que 59 de las 336 muestras obtenidas estaban contaminadas con *Brucella*. 20 de estas muestras provenían del calostro fresca (CF), 19 de Calostro con tratamiento térmico (CTT) y 20 de calostro al momento de del suministro a las becerras (CS). La identidad de 10 muestras aleatorias de este grupo de muestras positivas a *Brucella* fue confirmada molecularmente por PCR.

En el capítulo 6, Conclusión, se evaluó la aceptación o rechazo de la hipótesis y el cumplimiento aceptable de los objetivos, así como las implicaciones teóricas y productivas derivadas directamente de las evidencias más relevantes producidas por el estudio y la aplicación práctica del estudio. Los resultados obtenidos en este estudio de sondeo indican que el riesgo de contaminación microbiana presente en las muestras del calostro no disminuyó significativamente entre el calostro fresco, tratado térmicamente y hasta el momento de ser suministrado con biberón. Estos resultados sugieren que en condiciones de campo la implementación de prácticas de manejo de tratamiento térmico de calostro bovino para reducir el riesgo de transmisión de *Brucella* de adultos a becerras de remplazo es insuficiente para reducir el riesgo de contaminación en las diferentes etapas de proceso.

En la Bibliografía se enlistan las referencias mencionadas en todos los apartados referidos para la elaboración de este informe. También se incluyen diversos Anexos que detallan de manera pormenorizada las técnicas instrumentales que serán aplicadas para la obtención de la información.

2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

2.1. ORIGEN, EVOLUCIÓN Y ESTADO ACTUAL DEL PROBLEMA

El uso de la pasteurización para el tratamiento térmico al calostro se ha generalizado con diferentes protocolos de tiempo y temperatura que han recomendado los fabricantes de equipos. Sin embargo, las recomendaciones usualmente no se basan en estudios que demuestren la eficacia de los protocolos de tratamiento térmico. Existen alrededor de 50 artículos científicos en los últimos años que proponen y revisan métodos y manejo especializados en calostro para criar más eficientemente los remplazos en los establos y el ganado que se destina al abasto en razas productoras de leche como en especializadas en carne. Una forma de verificar si la transferencia de inmunidad pasiva fue efectiva es revisar la proteína total en sangre por refractómetro de 24 a 48 h después de suministro (Quezada, *et al.*, 2014).

En México no se han hecho suficientes estudios en campo para evaluar el tratamiento térmico al calostro por lo que la presente investigación trató de estudiar la eficacia en la disminución en contaminación de bacterias patógenas y la concentración de inmunoglobulinas en el calostro, así como demostrar la ocurrencia de una gran variabilidad de procesos como cadena de riesgos, al tomar muestras de calostro fresco, tratado y suministrado para evaluar el efecto del tratamiento térmico.

La cinética de destrucción bacteriana en diferentes medios o productos se realiza por exposición a un agente letal físico o químico, que reduce progresivamente el número de bacterias o agentes, en forma de curva de sobrevivencia en función del tiempo con un exponencial decreciente. Las condiciones ambientales que afectan fundamentalmente la cinética de destrucción son (Vignoli, 1986):

- 1) La concentración del agente o bacteria.
- 2) El tiempo de exposición.
- 3) El pH del medio o producto.
- 4) La temperatura
- 5) La presencia de materiales extraños o contaminación.
- 6) La resistencia propia del microorganismo.

Para leche o calostro se utiliza comúnmente el método de desinfección por temperatura y tiempo por calor húmedo; el mecanismo de acción por esterilización térmica destruye a los microorganismos en forma gradual por la suma de distintos eventos complejos que se van sucediendo a medida que aumenta la temperatura por lo que el efecto final de la esterilización por calor húmedo a 121 °C es la desnaturalización y coagulación de las proteínas, por lo que para la leche o calostro en particular existen protocolos de pasteurización o TT específicos para cada producto.

El primer efecto letal del calor es la producción de rupturas de la cadena del ADN, lo que provoca la muerte celular por activación o liberación de enzimas con actividad de endonucleasas. La capacidad de resistencia de la célula es su capacidad para reparar la lesión en ADN, función que depende del estado genético y fisiológico de la bacteria. A medida que aumenta la temperatura se agregaría la pérdida de la integridad funcional de la membrana citoplásmica, lo que produciría interferencias en el intercambio con el medio externo, los procesos respiratorios y la síntesis proteica.

También, las temperaturas más elevadas activan las ribonucleasas que degradando el ARNr producen la pérdida de viabilidad de las células expuestas, lo que provoca la destrucción de gérmenes patógenos, con resistencia térmica similar o inferior a *Brucella* y *Salmonella* y *Mycobacterium bovis*, *M. avium* y *M. tuberculosis*. Las temperaturas a la cual puede usarse el calor húmedo son:

- Tratamiento térmico <62 °C
- Pasteurización, 65°C a < de 100 °C,
- Ebullición y Tindalización =100 °C,
- Esterilización con autoclave > 120 °C.

Los métodos recomendados para pasteurización son a) 65 °C por 30 s y 72 °C por 15 s enfriando rápidamente la temperatura a menos de 10 °C. Esta técnica se utiliza fundamentalmente en la descontaminación de la leche y bebidas. La ebullición consiste en mantener un objeto o sustancia en un baño a 100 °C a nivel del mar durante 30 min (en Aguascalientes el punto de ebullición es de 94 °C). Aplicado así, destruye la mayoría de las formas bacterianas vegetativas, hongos y virus lipídicos (e.g. Herpesvirus y HIV); no es efectivo para la destrucción de esporas y virus desnudos. La repetición de este proceso durante tres días consecutivos constituye la tindalización. Su fundamento teórico está dado por la destrucción de las formas vegetativas durante los períodos de ebullición, permitiendo que las esporas germinen durante el reposo volviéndose susceptibles al próximo

calentamiento. La autoclave es el único método de esterilización, ya que todos los anteriores sólo reducen exponencialmente el número de bacterias. La autoclave utiliza vapor de agua a 121 °C durante 15 min ó 20 min. Esta temperatura se logra si se obtiene una presión de una atmósfera relativa (dos atmósferas absolutas), ya que el aumento de la presión provoca aumentos proporcionales en el punto de ebullición del agua.

Se ha recomendó emplear un protocolo de TT al calostro bovino de 60 min a 60 °C (Godden *et al.*, 2006), aunque reconoce que la prevalencia de enfermedades no ha disminuido en los ranchos en los años de uso del calostro tratado (Donahue *et al.*, 2012). (Godden *et al.*, 2015), (Tabla 2) menciona que el protocolo no asegura la eliminación de *Mycobacterium avium* en las becerras que recibieron calostro tratado después de seguimiento por algunos años (Godden *et al.*, 2015).

Tabla 2 Tratamiento térmico y recuperación de *Mycoplasma bovis*, *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella enteritidis*, *Listeria monocytogenes* y *Mycobacterium avium* (Map).

Especie bacteriana	Duración a 60°C (min)												
	-30	-30	0	15	30	45	60	75	90	105	120	120	
(dosis de inoculación, UFC/mL)	(20) ²	(20) ³	60	60	60	60	60	60	60	60	60	60	38
<i>M. bovis</i> (1 × 10 ⁸)	ND	G	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
<i>E. coli</i> O157:H7 (1 × 10 ⁶)	ND	G	G	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
<i>S. enteritidis</i> (1 × 10 ⁶)	ND	G	G	G	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
<i>L. monocytogenes</i> (1 × 10 ⁶)	ND	G	G	G	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
<i>M.a. paratuberculosis</i> (1 × 10 ³)	ND	G	G	G	G	G	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Map lote 1	C	C	G	G	G	G	G	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Map lote 2	C	C	G	ND	G	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Map lote 3	ND	G	G	G	ND	G	ND	G	G	ND	ND	ND	ND
Map lote 4	ND	G	G	G	ND	G	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND

¹Los Resultados son promedios de cuatro réplicas. Para Map, se presentan valores promedio e individuales. C = contaminado; G = crecimiento detectado; ND = no se detecta crecimiento.

²P Muestra de preinoculación (control negativo); -30 representa un tiempo de 30 min antes de que se alcanzara la temperatura prevista.

³P Muestra postinoculación (control positivo); -30 representa un tiempo de 30 min antes de que se alcanzara la temperatura prevista.

Fuente: (Godden *et al.*, 2006)

La importancia de la recría se acentúa por el cuidado más intensivo, derivada del alto precio de la carne y la baja rentabilidad en la producción de leche a nivel mundial. Una adecuada rentabilidad depende de la eficiencia en el sistema de producción de leche, tanto en la reproducción, sanidad, genética, alimentación, manejo de instalaciones en ganado en

producción, sin embargo, en la recría se considera que es más importante ya que es el reflejo de la próxima generación de reemplazos para el establo (Romo *et al.*, 2014).

2.2. CONDICIONES LOCALES QUE PERMITEN ABORDAR EL PROBLEMA

En los establos del altiplano central mexicano encontramos diferentes esquemas de manejo de recría; algunos en jaulas de madera individuales, otros en naves de jaulas contiguas, elevadas y en piso, así como en corrales de lactancia o becerras amarradas individualmente. Cada sistema tiene ventajas y desventajas, tanto en la ventilación como en la limpieza, contaminación y contagio; algunos cuentan con la ventaja de la luz solar como un método de desinfección natural, mientras que otros utilizan la limpieza a base de chorro de agua y el ambiente controlado; también representa alguna ventaja la cama de tierra y la crianza individualizada, pero tiene como desventaja la facilidad de contagio y brotes de enfermedades por contacto directo o por medio de vehículos y vectores, difícilmente controlados por los métodos usuales de higiene y manejo el estiércol y humedad.

El factor común de mayor variabilidad es la calidad del calostro producido por la vacas, la contaminación por bacterias patógenas, la concentración de inmunoglobulinas, la transferencia de inmunidad pasiva, y la colonización por inoculación precoz de bacterias (Figura 1) o flora intestinal benéfica pro-digestiva o patógena, lo que significa la presencia o ausencia y gravedad de enfermedades y se refleja en morbilidad, mortalidad, crecimiento y ganancia diaria de peso de las becerras, parámetros por los cuales evaluamos el desempeño de la recría en las explotaciones. En el altiplano central mexicano el porcentaje de mortandad en becerras al destete fluctúa entre 2.0 a 30 % con un promedio de 18 % en los establos y granjas sin que se tenga claro el origen del problema (SAGARPA, 2015).



Figura 1 Becerro al momento del parto mostrando partículas de materia fecal en la lengua sugiriendo una contaminación precoz del recién nacido

2.3. HIPÓTESIS DE INVESTIGACIÓN

El tratamiento térmico en campo al calostro bovino empleado en diferentes establos presenta variaciones significativas en la eficacia para conservar la concentración de inmunoglobulinas evitar la falla de transferencia de inmunidad pasiva a las becerras y contrarrestar la contaminación por bacterias patógenas.

2.4. OBJETIVOS

2.4.1. Objetivo general

El objetivo del estudio es evaluar las variaciones que existen en la eficacia del tratamiento térmico de calostro en condiciones de campo para conservar la concentración de inmunoglobulinas evitar la falla de transferencia de inmunidad pasiva y contrarrestar la contaminación por bacterias patógenas.

2.4.2. Objetivos específicos

2.4.2.1. Evaluar el efecto del tratamiento térmico en condiciones de campo en la conservación de la concentración de inmunoglobulinas en el calostro bovino.

2.4.2.2. Estimar la falla de transferencia de inmunidad pasiva de las becerras mediante la prueba de refractometría de proteína total del suero sanguíneo a 48 horas de suministro.

2.4.2.3. Evaluar la eficacia del tratamiento térmico en condiciones de campo al calostro bovino, para contrarrestar la contaminación por bacterias patógenas.

2.5. JUSTIFICACIÓN

2.5.1. Importancia del estudio

El uso de la pasteurización para el tratamiento térmico al calostro se ha generalizado, sin embargo, la prevalencia de enfermedades no ha disminuido en los años de uso del calostro tratado (Donahue *et al.*, 2012). También se ha incrementado el uso de calostro bovino en polvo como herramienta para sustituir y suplementar el consumo en crías de bovino, así como en otras especies y algunos humanos. La variabilidad en la calidad de calostro toma una relevancia porque el mercado de la carne llega a precios muy altos, lo cual incrementa el interés por disminuir los riesgos de transmisión de enfermedades y la morbilidad y mortalidad en crías vacunas (Carrisoza, 2104).

Existe una relación inversa entre la eficacia bacteriológica e inmunológica, se reporta que la temperatura máxima para proteger la integridad, cantidad y eficacia de la inmunoglobulina es máximo 60 °C por 60 minutos, no afectando el tiempo para este propósito, pero al contrario la temperatura afecta gravemente la integridad, cantidad y eficacia de las inmunoglobulinas hasta en más de 33 % cuando llega a 63 °C sin importar el tiempo de permanencia a la temperatura por corto que se mantenga, por lo que la calidad se disminuye peligrosamente (McMartin *et al.*, 2006)

El aumento de temperatura disminuye la cantidad de inmunoglobulinas y afecta la viscosidad del calostro reportando alteraciones significativas que pueden comprometer el proceso de transferencia pasiva de inmunidad a la becerro con resultados muy diversos que no se han podido estandarizar (Elizondo y Heinrichs, 2008).

2.5.2. Importancia en el ámbito científico

Estudios anteriores han demostrado que el tratamiento térmico es capaz de reducir el 100% del crecimiento bacteriano mientras que solamente reduce el 10% de la inmunoglobulina IgG después del proceso; lo que significa que el calostro se considera aceptable en la carga bacteriana y en la cantidad de inmunoglobulina IgG para garantizar el aporte mínimo necesario para la supervivencia de la cría de bovino (Godden *et al.*, 2006). Aunque en

condiciones de campo se aprecia frecuentemente una cantidad importante de becerros que presentan falla de transferencia de inmunidad pasiva (Deelen et al., 2014) y también es notorio que la prevalencia de enfermedades no ha disminuido en los ranchos que dan tratamiento térmico al calostro a pesar de tener varios años aplicándolo (Donahue et al., 2012).

Este estudio encuentra en campo presencia de bacterias patógenas en calostro que no deberían estar presentes y que pueden ser causa de variaciones en el proceso en campo que son muy difíciles de controlar y minimizar los riesgos de transmisión de enfermedades en condiciones cotidianas de campo por falta de pruebas rápidas y económicas para evaluar la eficacia del proceso térmico.

2.5.3. Importancia en las tecnologías de producción

El desarrollo de nueva tecnología y mejores técnicas para el uso de calostro inocuo asegura la disminución de riesgo de transmisión de enfermedades de la vaca a la becerro (Gulliksen et al., 2008.) La prevalencia de las enfermedades disminuye la rentabilidad de los establos. En México existen diferentes sistemas de producción de leche y carne de acuerdo a la zona geográfica y los recursos hídricos, por lo que los costos de producción varían notablemente de una región a otra, sin embargo, algunas herramientas y tecnologías promueven la eficiencia de los sistemas buscando la rentabilidad y son adoptadas por los ganaderos progresistas como innovación, así fue la inseminación artificial hace 50 años, y actualmente cualquier establo moderno no duda en usar esa tecnología como una herramienta fundamental y cotidiana, el calostro en polvo es usado por ganaderos progresistas que identifican las ventajas de esta herramienta.

2.5.4. Importancia social

Evitar la transmisión de enfermedades de la vaca a los humanos y la inocuidad de los productos de origen animal es el propósito de la pasteurización y los tratamientos térmicos (Grant et al., 2005). El origen de la pasteurización se remonta para evitar la transmisión de enfermedades de los productos de origen animal al humano y evitar las zoonosis.

2.5.5. Importancia económica

La afectación directa a la producción se puede evaluar y cuantificar en pérdidas por alta mortalidad y alta morbilidad y bajo rendimiento en ganancia de peso (Elizondo y Heninrichs,

2008). El costo que generan lagunas enfermedades como la brucelosis es muy importante en establos contaminados, son difíciles de cuantificar por los ganaderos, es necesario contabilizar pérdidas por abortos, lactancias incompletas, menos becerras para reemplazo, pérdida de volumen de leche por evento, amortización de los activos muebles, semovientes y fijos, incremento en el uso de medicina y descarte de leche por antibióticos

El cálculo de referencia lo hacen autoridades en la materia, pero son referencias y estimaciones de los problemas, es necesario contar con herramientas tecnológicas y software que cuantifique específicamente el ingreso y egreso por evento y día de vida productiva para observar cuentas reales para análisis de la rentabilidad de los establos, así como la capacidad de competir en el mercado internacional.

2.5.6. Importancia ambiental

El desarrollo ambientalmente responsable de cualquier actividad productiva pecuaria garantiza el equilibrio para la producción y equilibrio de conservación del medio ambiente, cada acción que se realice a favor colabora en cierto grado con pequeños avances y contribuye a mitigar los efectos por el cambio climático.

3. MARCO TEÓRICO

3.1. ORIGEN DEL CALOSTRO BOVINO

El calostro es la primera secreción láctea producida por la vaca y consumida por la cría, se genera al final del parto, en las tres semanas finales de gestación y justo hasta el momento de le parto en bovinos (Zurita, 1994).

El calostro es un producto biológico muy activo que, además, tiene un alto contenido de nutrientes (Tabla 3). Los compuestos bioactivos incluyen anticuerpos, entre los que se destacan concentraciones muy altas de inmunoglobulinas (IgG, IgM, IgA), proteínas, aminoácidos esenciales, ácidos grasos, grasa butírica, lactosa, vitaminas y minerales (Kehoe *et al.*, 2007). Además, el calostro contiene activadores celulares y diversas sustancias bioactivas como promotores de crecimiento, lactoferrina, hormona péptida, factores de crecimiento, citoquinina, nucleótidos, hormonas esteroides, tiroxina, poliaminasas y enzimas (Koldovsky, 1989). Así mismo, el calostro tiene efectos sobre la motilidad del intestino, de tal forma que, al ser ingerido por el recién nacido, activan los movimientos peristálticos en el colon ayudando a expulsar el meconio y facilitando el establecimiento de todos los movimientos normales del intestino (Lazzaro, 2002). También contiene bacterias que conforman la flora normal del intestino y mucosas del becerro, al colonizar y reproducirse en el intestino desdoblando azúcares para multiplicarse.

Tabla 3 Variación de la composición química del calostro según número de ordeños de calostro

Descripción	Número de ordeño			Leche
	1	2	3	
Gravedad específica	1.056	1.040	1.035	1.032
Sólidos totales %	23.9	17.9	14.1	12.9
Proteína total %	14.0	8.4	5.1	3.1
Caseína %	4.8	4.3	3.8	2.5
Inmunoglobulinas G (g/L)	48.0	25.0	15.0	0.6
Grasa %	6.7	5.4	3.8	3.7
Lactosa %	2.7	3.9	4.4	5.0
Ca %	0.28	-	-	0.13
P %	0.24	-	-	0.11

Fuente: Besser (1985)

El calostro tiene una cantidad de nutrientes mucho mayor que la leche, tanto en sólidos totales (2x), proteínas totales (4x), inmunoglobulinas (IgG) (24x), inhibidor de

tripsina (100x), energía y grasas (2x). La grasa y lactosa en un calostro de buena calidad son de muy fácil transformación en una fuente de energía (Baumrücke *et al.*, 2014). La grasa es indispensable para la regulación de temperatura corporal, termogénesis y para la activación y estabilización del metabolismo de la cría en las primeras horas de vida. Al carecer o disminuir esta fuente de energía, la cría perderá hasta el 10% de su peso en los primeros dos días. Se ha reportado (Davis y Dreckley, 1998) que en sólo 18 horas se agota el almacenamiento de grasa corporal. En las primeras horas de vida es posible regular la temperatura hasta en un 15% (Haines y Campos, 2008).

Leblanc revisa el papel del metabolismo de la energía en el periodo de transición de la vaca y su impacto en la producción de calostro de buena calidad. En esta etapa crítica se presentan diversas enfermedades y se alteran los procesos fisiológicos relacionados con la reproducción (Leblanc, 2010).

Todas las vacas en este periodo experimentan cierto nivel de resistencia a la insulina y desordenes metabólicos leves y sólo la tercera parte de las vacas presentan desordenes metabólicos clínicamente detectables o en grado que comprometa la producción, eficiencia productiva y la vida de éstas; por lo que al monitorear los niveles de producción, temperatura, consumo de materia seca y tasas de desecho y mortandad tradicional, ahora se puede monitorear el nivel de ácidos grasos no esterificados (NEFA) y beta hidroxybutirato (BHBA), por lo que son indicadores después del parto para detección temprana de presuntos desordenes metabólicos y riesgos de enfermedades en las vacas (Leblanc, 2010).

Un nivel alto de NEFA (> 0.4 mmol/L) entre 7 y 10 días preparto se asocia al incremento de riesgo para desplazamiento de abomaso, retención de placenta, desecho antes de 60 días, menor producción de leche en los primeros cuatro meses. La cetosis subclínica (1.2 a 1.4 mmol/L de BHBA en suero) en la primera y segunda semana post parto se asocia al riesgo de desplazamiento de abomaso, metritis, cetosis clínica, endometritis, no-ovulación post parto, incremento en la severidad de mastitis y menor producción en la lactación temprana. Por lo que existen diferentes métodos para medir y evaluar las condiciones de NEFA Y BHBA para minimizar riesgos de manera preventiva en campo (Leblanc, 2010).

3.2. INMUNOGLOBULINAS MATERNAS

Las inmunoglobulinas son proteínas que protegen e identifican y destruyen patógenos en los animales (Morin *et. al*, 2001) Existen tres tipos diferentes de inmunoglobulinas (Ig) en el calostro materno, la IgG (88%), IgM (7%), IgA (5%). Estas inmunoglobulinas son de diferente tamaño y configuración molecular (Hurley *et al.*, 2011). La IgG tiene dos subclases dos: IgG1 (80% a 90%) y IgG2 (10% a 20%) del total del IgG (Larson *et al.*, 1980).

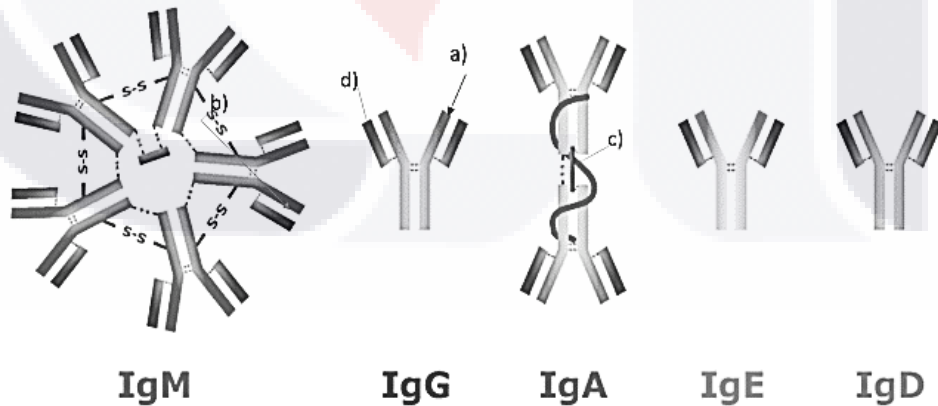
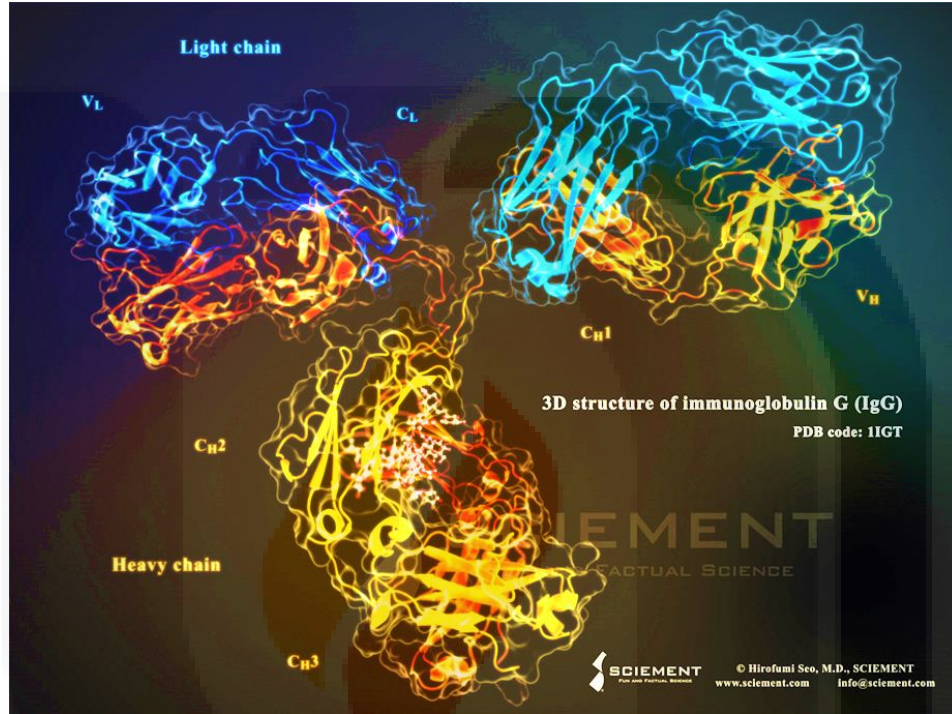


Figura 2 Estructura molecular de las inmunoglobulinas. Panel A. Estructura tridimensional

Panel B estructura bidimensional de diferentes tipos de inmunoglobulinas. a) Región hipervariable (cadena ligera). b) Cadenas de disulfuro c) Cadena J (join) d) Región variable (cadena pesada).

Fuente: The CGSociety (2017) <http://hirofumi.cgsociety.org/art/igg-maya-antibody-mental-medical-ray-pdb-after-effects-python-3d-structure-immunoglobulin-g-1204012>

3.3. TRANSFERENCIA DE INMUNIDAD PASIVA

La transferencia de inmunidad pasiva es el proceso fisiológico que permite a los rumiantes adquirir inmunidad que requieren las crías por absorción de inmunoglobulinas Ig's en el intestino en las primeras horas de vida. Esto es necesario porque los bovinos tienen un tipo de placentación sindesmocorial, (Godden *et al.*, 2009) lo que incapacita la transferencia sanguínea de inmunidad desde la madre hacia el producto durante la preñez, pues se genera una barrera (sincitio) (Elizondo, *et al.*, 2010), entre madre-producto para las macromoléculas, que no pasan al flujo sanguíneo de la cría, generando entonces al nacimiento una cría agamaglobulinémica y sin defensa contra patógenos (Weaver *et. al*, 2000), las paredes del intestino tienen enterocitos que son capaces de absorber grandes moléculas, mediante absorción por pinocitosis hasta 24 horas después de haber nacido para transferir pasivamente Ig's (macromoléculas) a la cría (Haines y Campos, 2008).

La absorción de inmunoglobulinas Ig's es a través de macromoléculas que viajan por un medio transporte transitorio, el cual no es selectivo en el epitelio de la pared del intestino. Las Ig's entran a las células y a la linfa intestinal al conducto torácico para posteriormente avanzar por el torrente sanguíneo (Besser *et. al*, 1991). Las inmunoglobulinas son transportadas a través de las células y en los vasos linfáticos por exocitosis (Staley *et. al*, 1972.)

Las Ig's pueden moverse fuera del torrente sanguíneo y avanzar a otras partes del cuerpo, su función principal es de identificar y ayudar a destruir los patógenos invasores (McMartin *et al.*, 2006), previniendo además la fijación de patógenos, inhibiendo el metabolismo, la aglutinación de bacterias, neutralizando virus y bacterias (Liu *et al.*, 2009). Las IgM son moléculas grandes de IgG que están encargadas de la primera línea de defensa en caso de septicemia, las que permanecen en la sangre protegiendo a la cría de bacterias. Las IgA protegen la superficie mucosa del intestino impidiendo la adhesión patógenos (Godden *et al.*, 2006).

El mecanismo de cierre del paso de macromoléculas en el intestino a las 24 de nacido es probable que se deba a la combinación del agotamiento de la capacidad pinocitosis y el reemplazo los enterocitos por de las células epiteliales maduras del intestino delgado (Hompson, 1981)

Se ha señalado que el calostro produce un recubrimiento con lactoferrina en la pared interna del intestino, debido a sus propiedades antimicrobianas protege de bacterias patógenas externas que entren al conducto del intestinal, y además favorecer el desarrollo de una flora intestinal beneficiosa (Plaza *et al.*, 2009.).

Existen diferentes métodos para suponer que la transferencia pasiva de inmunidad es exitosa o adecuada para garantizar la supervivencia de las beceras, como es la prueba de refractometría simple (Deelen *et al.*, 2014), y el refractómetro óptico, digital y la prueba de inmunodifusión radial, (Weaver *et. al*, 2000), en el primero las lecturas de referencia de proteína total se consideran aceptables de 5.0 a 5.5 g/dL como el mínimo indispensable para la supervivencia y desempeño de la beceras.

3.4. ABSORCIÓN Y TRANSPORTE DE INMUNOGLOBULINAS

Las Ig's del suero de la glándula mamaria comienzan a producirse varias semanas antes del parto y su máxima concentración ocurre entre 1 a 3 días antes del parto (Weaver *et. al*, 2000). Estas se transfieren a la secreción láctea desde dos fuentes: las humorales, provenientes de la circulación sanguínea (IgG) y las otras dos que son sintetizadas por plasmocitos (IgM, IgA) ubicados junto al epitelio secretor de la glándula mamaria, son específicas del calostro (Nickerson, 1989).

La concentración de IgG1 en el calostro se ve favorecida por los receptores en las células epiteliales alveolares de las glándulas mamarias, estas células epiteliales glandulares dejan expresar el receptor (IgG) al comienzo de la lactancia. (Hurley *et al.*, 2011).

Las alteraciones de expresión son probablemente provocadas por la respuesta al aumento en la concentración de prolactina (Weaver *et. al*, 2000). La absorción de Ig's varía de acuerdo con la edad de la primera toma, que se recomienda en las primeras horas de vida y la cantidad de calostro ingerido, además de la concentración de IgG en el calostro (Besser *et. al*, 1991). La cantidad de inmunoglobulina transferida en las primeras horas de vida asegura una transferencia pasiva exitosa y disminuye el riesgo de morbilidad y mortandad de la cría (Campos y Godson, 2003), la cantidad mínima de IgG para garantizar la supervivencia es de 1.0 g/dL en las primeras dos horas de vida (Haines y Campos, 2008).

La concentración en suero sanguíneo de proteína total es de 10 g/L (Kehoe, *et al.*, 2007), la referencia de lectura en refractómetro de 5.0 a 5.5 g/dL confirma el éxito de la

transferencia de inmunidad pasiva compromete el desarrollo y viabilidad de la cría (Weaver *et al.*, 2000). Se considera falla de transferencia de inmunidad pasiva cuando el valor de lectura de Ig's es inferior. La falla en la transferencia de inmunidad pasiva predispone a mayor riesgo de morbilidad y mortandad, así como deficiente desarrollo y crecimiento, pobre ganancia diaria de peso y difícil recuperación por enfermedad por colonización de bacterias en el intestino (Gelsinger *et al.*, 2015). La edad y el número de lactancia puede determinar la calidad del calostro en cuanto a la cantidad de proteína total, grasa e Ig's (Liu *et al.*, 2009). Algunas prácticas para determinar la calidad del calostro son utilizadas para clasificar y suministrar el calostro de mejor calidad disponible, por lo que la correlación de densidad y grados Bx, ayuda a determinar la clasificación con más certeza como se observa en la Figura 3.

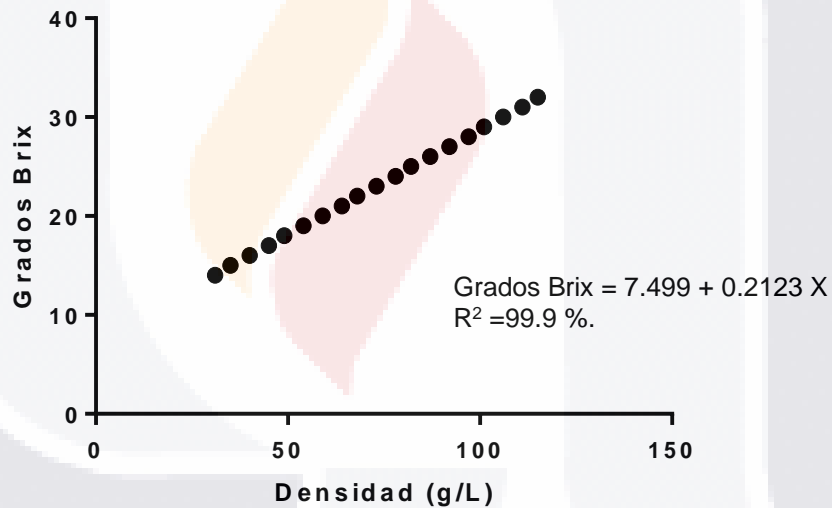


Figura 3 Correlación entre la densidad y el valor de grados Brix. Elaboración propia con datos de Campos, 2003.

La cantidad de absorción de Ig's depende de varios factores asociados a la forma de alimentación de calostro. Un primer factor que influye en la cantidad global de inmunoglobulinas absorbidas es la concentración de Ig's en el calostro y el tiempo

transcurrido entre el nacimiento y la primera alimentación. Sin embargo, estos factores son difíciles de medir en condiciones de campo durante el amamantamiento natural.

La falla en la transferencia de inmunidad pasiva ocurre frecuentemente por no controlar la cantidad, la calidad y la oportunidad de la ingestión del calostro y dejar amamantar libremente a la vaca; ya que sólo supone el volumen y la calidad del calostro ingerido. Sin embargo, este método no funciona en explotaciones con un grado alto de exigencia productiva y se vuelve una condición de riesgo de brote de enfermedades infectocontagiosas (Tabla 4).

Tabla 4 Factores de riesgo para transferencia de inmunidad pasiva e inocuidad

Factor de riesgo
Calidad de calostro
Temperatura
Hora de alimentación después del nacimiento
Método de alimentación
Tipo de parto
Sufrimiento Fetal
Número de lactancia
Distocia
Raza
Volumen ingerido
Número de veces alimentado
Alimentación hasta el parto
Factores que afectan la inocuidad del calostro
Edad de la vaca
Salud al secado
Salud de la ubre al secado
Vacunación al secado
Tipo de ordeño manual o mecánico
Uso de presello y limpieza de pezón
Desinfección de unidad de ordeño
Uso de guantes por personal
Limpieza de recipientes y tapas para separación de calostro
Transporte de calostro en recipientes cerrado
Transporte de calostro en móvil desinfectado
Otros Factores
Paridero común o individual
Intervención de personal
Salud del personal
Presencia de fauna nociva
Presencia de perros y gatos
Limpieza general de la vaca al momento del parto
Manejo de placentas y líquidos intrauterinos
Uso individual de agujas

Factor de riesgo

Uso de individual de guantes

Limpieza y sanitización de equipo para tratamiento térmico

Tiempo de Tratamiento

Temperatura de Tratamiento

Tiempo para llegar a temperatura de protocolo o calentamiento

Tiempo de enfriamiento y envasado

Tiempo de envasado a congelamiento

Temperatura de refrigeración

Tiempo y temperatura para congelamiento y conservación

Uso de bitácora y registros

Tipo de equipo y marca

Suministro oportuno de gas o electricidad

Control de calidad e inocuidad

Uso de diferentes recipientes para calostro fresco y tratado

Tipo de envase para tratamiento térmico desechable o reusable

Tipo de envasado antes de tratamiento o posterior

Uso de guates, tapabocas y cofia por personal

Forma de conservación refrigerado o congelado

Forma de descongelado y atemperamiento

Tiempo de descongelado y atemperamiento

Tiempo de suministro de atemperamiento a suministro

Sanitización de manos y equipo entre alimentación de cada becerra

Forma de agrupar las becerras previo calostreo

Contacto de becerras con madres

Contacto de becerras con otras vacas

Contacto de becerras con otras becerras

Contacto de becerras con personal de ordeña

Contacto de becerras con otro tipo de personal

Desinfección de la jaula o corral

Forma de secado de becerras nacidas

Flujo de aire y polvo

Adaptado de (Besser, 1985.)

Dentro de las técnicas utilizadas para controlar la primera alimentación se encuentran el uso de biberón y mamila; este método es adecuado técnicamente para medir la cantidad y el tiempo de suministro; sin embargo, requiere que el becerro responda adecuadamente mediante el proceso de succión y deglución, el que incluye el cierre del surco esofágico del rumen y su depósito apropiado en el abomaso.

Cuando las crías provienen de un parto difícil o retardado y carecen de la fuerza necesaria para responder con el reflejo de amamantamiento, entonces se ha empleado el uso de sonda esofágica; sin embargo, una parte del calostro se aloja en el rumen, lo que no permite la absorción de Ig's, se fermenta produciendo cólico e induciendo lesiones e inflamación del tracto faríngeo-esofágico y riesgo de administrar calostro en vías respiratorias y generación de neumonía mecánica fatal o shock respiratorio. Si la técnica es aplicada por personal bien entrenado, entonces puede funcionar adecuadamente incrementando la cantidad a compensar el desperdicio ocasionado por el desvío hacia el rumen (Besser *et al.*, 1991).

El calostrómetro es la forma más común para medir la calidad del calostro en campo, esta prueba mide la densidad y hace referencia a que una mayor densidad a 22 °C, es un indicador de la cantidad de proteína y grasa sin saber la distribución de éstas. Otro método en campo es usar el refractómetro digital para medir en grados Brix la cantidad de proteína total y tener una referencia con más certeza.

Los grados Brix (°Bx) sirven para determinar el cociente total de materia seca (generalmente azúcares) disuelta en un líquido. Una solución de 25 °Bx contiene 25 g de sólido disuelto por 100 g de disolución total. La calidad del calostro disminuye conforme el número de ordeñas aumenta. (Deelen *et al.*, 2014).

El tiempo es otro factor que afecta la transferencia pasiva de inmunidad a la becerro ya que los canales abiertos en el intestino tienden a cerrarse paulatinamente como transcurre el tiempo, se reporta que hasta las cuatro horas después del nacimiento hay capacidad de transferir por absorción en el intestino las macromoléculas de IgG, aunque la eficiencia de suministro entre la primera y segunda hora mejora los indicadores de desempeño de la becerro en la crianza (Liu *et al.*, 2009)

La capacidad de absorción y transferencia de macromoléculas IgG a partir de las seis horas post parto disminuye considerablemente y paulatinamente hasta las 12 horas posteriores, cuando se considera que termina prácticamente la transferencia pasiva, comprometiendo la cantidad de IgG mínima para la supervivencia de la becerro (Campos,

2000). Se encuentra que aparte de la calidad y cantidad de inmunoglobulina en el calostro el tiempo es relativamente el mayor importante para realizar la eficaz transferencia pasiva de inmunidad juntamente con el volumen ingerido (Patel *et al.*, 2014).

3.5. FACTORES QUE AFECTAN LA TRANSFERENCIA DE INMUNIDAD PASIVA.

Existen factores de medio ambiente que comprometen el éxito de la transferencia pasiva de inmunidad, como son la limpieza e inocuidad de las instalaciones, el tipo de parto (gemelar, distócico, prematuro o con sufrimiento fetal), así como las maniobras ejecutadas por el personal de asistencia al parto (Weaver *et. al*, 2000), así como la temperatura ambiental tanto frías como calurosas fuera del rango de clima templado y seco entre 10 y 28 °C (Liu *et al.*, 2009).

En el periodo de transición existen enfermedades que pueden alterar la calidad y cantidad de calostro y que pueden presentarse con distintos factores nutricionales de riesgo y tienen la característica de estar relacionadas.

Para minimizar esos factores de riesgo, durante el período de transición hay que lograr una paulatina adaptación del rumen a las dietas de alta densidad energética y proteica que se ofrecen en la lactancia temprana, maximizar la recuperación del consumo voluntario que se ve deprimido durante el periparto e implementar una suplementación vitamínico-mineral que alivie el estado de inmunosupresión que caracteriza el período y que prevenga las hipocalcemias puerperales clínicas y subclínicas.

Se analizó, además, la influencia del balance energético y el ingreso proteico sobre la eficiencia reproductiva, así como los factores nutricionales asociados a enfermedades podales y la importancia de los llamados “nutrientes antioxidantes”.

En el sistema de pastoreo se enfatiza en el manejo diferencial de nutrientes, la respuesta en comportamiento de ingesta, los mecanismos endocrino-moleculares de la partición de nutrientes y su relación con la fertilidad en vacas lecheras. Se reportan experimentos que estudian la eficiencia productiva de diferentes biotipos lecheros y razas (Cavestrany, *et al.*, 2005).

Se describen trabajos en salud que identifican el período de transición como período de riesgo a enfermedades metabólicas, infectocontagiosas y traumáticas. Se concluye que los estudios integrados en problemas de relevancia nacional es la respuesta necesaria a

sistemas biológicos complejos como lo es la vaca lechera durante el período de transición en pastoreo.

Desordenes metabólicos y enfermedades en la transición: La mayoría de estas afecciones ocurren en el peri-parto y tienen la característica de estar fuertemente relacionadas entre sí.

- Enfermedades de la producción:
- Desórdenes metabólicos resultantes de deficiencias y/o desequilibrios nutricionales o asociadas a fallas en los mecanismos homeostáticos de control
- Cetosis clínica
- Hipocalcemia puerperal,
- Tetania hipomagnésica
- Acidosis ruminal
- Meteorismo espumoso
- Desplazamiento del abomaso,
- Conjunto de afecciones clínicas y subclínicas por cantidad y calidad del alimento
- Alteración del cuadro endocrinológico
- Concepto de entrada (Input) / Salida (Output) de alimento y producto,
- Alteración de los ejes metabólico-nutricionales que controlan el metabolismo del Ca, Mg y P y aquellos que regulan el uso de la energía de la dieta,
- Partos distócicos,
- Mortinatos
- Retención de placenta
- Endometritis
- Edema de ubre
- Mastitis
- Cojeras
- Predisposición Genética a alteraciones
- Estrés

En Noruega se estudió la calidad del calostro recolectado de vacas multíparas y primíparas y se analizó la calidad del calostro por la prueba de inmunodifusión radial de manera individual y mezclando calostro para hacer lotes homogéneos por día, el contenido de IgG en las muestras de calostro vario desde 4 a 235 g/L, con una mediana de 45.0 g de

IgG/L (Gulliksen *et al.*, 2008.), donde la dosis mínima recomendada para la supervivencia de la cría es de 100 g/L (Barrington *et al.*, 2002).

Sin embargo, el 57.8% de las muestras contenían menos de 50 g/L de IgG como mínimo deseable, además se encontró que las vacas de cuarto parto o más producían niveles significativamente más altos de IgG por litro de calostro que las vacas de primera y segunda lactancia como las de menor calidad, sin embargo, en los establos tecnificados en el altiplano el promedio de lactancias varía entre 2.8 a 3.4 como permanencia de vida por lo que el número de vacas de 4 o más partos es reducido.

La época del año es otro factor que afecta la calidad del calostro. En un estudio en Noruega, se observó que el invierno afectó significativamente la cantidad de IgG en los meses de diciembre, enero y febrero comparado con las vacas que parieron en el resto del año, posiblemente los requerimientos de energía adicional propician esta condición, se correlaciona que a mayor cantidad de células somáticas menor calidad de calostro lo que puede ser un riesgo para evitar la falla de transferencia pasiva de inmunidad (Gulliksen, *et al.*, 2008.).

Se ha estudiado que la cantidad de calostro y leche producida en el periodo de transición, no tienen relación con el desempeño de pico de lactancia y producción total (Kessler *et al.*, 2014). Otro estudio señala que pasa con la vaca no tiene periodo de descanso o seco para recuperación de la ubre y la producción de calostro (Baumrücke *et al.*, 2014). Afirma que la falta de periodo seco en las vacas que se realiza como manejo en algunos establos, desapareciendo el tiempo de descanso de la ubre con el sistema de ordeño constante; que no existe diferencia significativa en la cantidad de IgG producida en calostro con valores entre 44 y 66 g/L, sin embargo, las vacas con periodo seco 0.0 tenían una variación en los picos por hora de concentración de IgG, mediante un incremento paulatino en la cantidad de IgG a partir del sexto día preparto.

Se atribuye a que la concentración de Ig's varía en vacas de ordeño constante por el flujo de leche a diferencia de la de secado por 60 días. Sin embargo, el estudio concluye que si hay diferencia en la producción de leche por lactancia total a 305 días (Baumrücke *et al.*, 2014)

3.6. ENFERMEDADES DE LA BECERRA

Las enfermedades más frecuentes en las becerras como diarrea y neumonía suelen aparecer en crías con falla de transferencia de inmunidad pasiva

Los agentes más frecuentes que causan diarrea son *Escherichia coli*, *Rotavirus*, *Coronavirus*, *Cryptosporidia*, (García *et al.*, 2014) *Coccidia* y *Salmonella* sp, con excepción de *Salmonella* y algunos tipos de *E. coli*, estos organismos están presentes y son endémicos en el tracto intestinal de animales maduros en pequeña concentración y sin signos clínicos.

El serotipo de *Salmonella typhimurium* y *Salmonella dublin* son importantes causas de diarrea en becerros lecheros y de carne (Barrington *et al.*, 2002).

En el caso de *E. coli* es la bacteria de mayor presencia en las heces de los animales de sangre caliente, y por lo mismo en el medio ambiente y las instalaciones. Todos los tipos de *E. coli* pueden causar colisepticemia y enfermedad entérica que se clasifican en enterotoxigénicas, enteropatógenicas, enteroinvasivas, enterohemorrágicas y enteroadherentes (Fecteau, 2002). En particular, el tipo enterotoxigénico es el común que se asocia con la diarrea de las crías, y tiene la habilidad de provocar severos brotes de diarrea, al expresar los factores de virulencia incluyendo adhesinas (Barrington *et al.*, 2002).

Rotavirus es un virus RNA de doble-barrera sin recubrimiento, es la causa más común de las diarreas neonatales en bovinos, la incidencia puede alcanzar el 100 % de los hatos, cuando una cría infectada se muestra clínicamente, la infección usualmente ocurre entre los 7 y 14 días de edad.

Coronavirus es un virus RNA de barrera simple con recubrimiento. No es un tan estable en el medio ambiente como el rotavirus; serológicamente se ha demostrado que la prevalencia de anticuerpos de coronavirus en suero se estima el 100% en ganado adulto de carne y leche.

Cryptosporidium parvum es un parásito protozoario que causa diarrea neonatal con sangre, en crías entre 7 y 21 días de edad, raramente producen diarreas antes de 5 días y después de 28. Similar al rotavirus y coronavirus la incidencia de infección de *Cryptosporidia* es frecuente el 100% en el primer mes de vida. (García *et al.*, 2014)

Eimeria bovis y *E. zurnii* son especies más comunes de coccidia que se asocian con diarrea en las crías con un periodo de incubación del parásito de 17 días a la exposición porque en crías recién nacidas expuestas pueden presentar diarrea con sangre y anemia para la tercera semana de vida.

La falla de transferencia de inmunidad pasiva a través de la ingestión de calostro es el mayor factor de riesgo para el desarrollo de diarrea neonatal en bovinos por

Staphylococcus spp, Enterobacterias Gram-negativas, coliformes y *Streptococcus uberis* (Barrington, *et al.*, 2002).

Se reporta un estudio en 84 muestras de calostro con alto contenido de bacterias (<100'000 bacterias/mL, y se encontró que el 35.9% se identificaron como contaminadas con *Staphylococcus* spp. (57.7%), enterobacterias Gram-negativas (47.9%), coliformes (44.0%), y *Streptococcus uberis* (20.5%) (Fecteau, 2002).

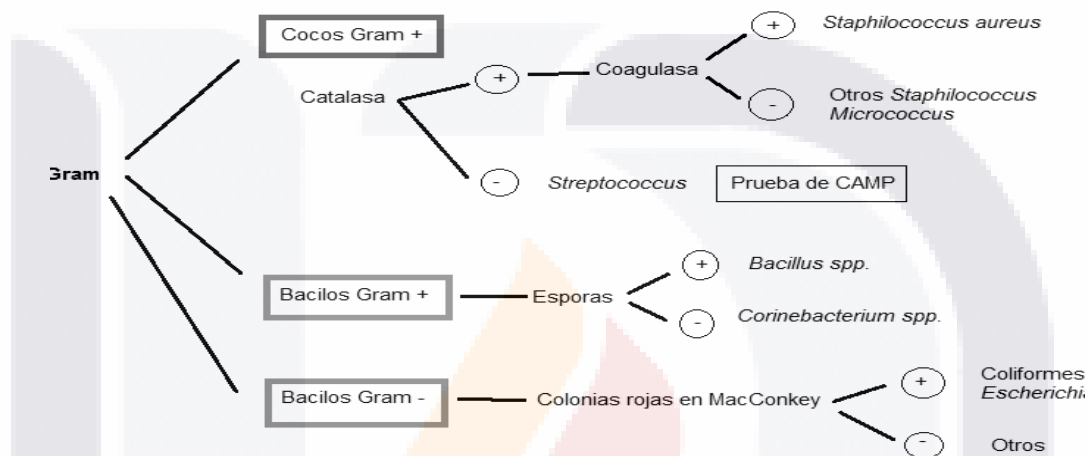


Figura 4 Identificación básica de bacterias por método de tinción de Gram

3.7 CALIDAD DE CALOSTRO

El uso de calostrómetro, refractómetro e IDR son los métodos empleados para la estimación de la concentración de Ig's. La prueba de inmunodifusión radial que identifica las inmunoglobulinas específicas IgG en agar en placa que reaccionan con el suero antígeno, formando un anillo de precipitación proporcional a la cantidad de inmunoglobulinas (Besser, 1985.)

La concentración media de Ig's en el calostro de bovino es de 45 g/L de IgG y 18 % de grasa (Gulliksen, *et al.*, 2008.).

Existen riesgos que pueden afectar la calidad del calostro en la cantidad producida por la vaca y la concentración de Ig's y grasa.

El periodo de transición en las vacas lecheras que se conceptualiza como el tiempo que la vaca se prepara para parir y el periodo postparto donde la vaca arranca la producción de leche eficazmente como consecuencia de un parto exitoso, y que garantiza la supervivencia de la cría y su desarrollo inicial para ser una gran productora de leche.

Existen diferentes riesgos que afectan la cantidad y calidad del calostro para consumo por las becerras para generar una transferencia pasiva efectiva de inmunidad, como las enfermedades y desordenes metabólicos, bacterianas, virales y errores de manejo que afectan la producción de calostro en las vacas.

Para el periodo de transición en la vaca lechera los avances de técnicas de alimentación y formulas han llevado a que la vaca pueda tener un mejor arranque de la lactancia y mejorar la capacidad de expresión genética, aunque este avance se presume con mayor potencial del que la vaca presenta por condiciones de explotación.

La transición en el ganado lechero del estado preñada no lactante al no preñado lactante es un período de cambios drásticos para la vaca, la cual debe adaptar su metabolismo a las fuertes exigencias que le demanda la producción, del equilibrio con que la vaca resuelva este proceso dependerá la capacidad de maximizar la producción y la calidad de la leche, de evitar enfermedades metabólicas y asegurar la siguiente preñez (Corbelini, 1999.).

La mejora nutricional, la selección genética y el manejo animal han aumentado la producción de leche en las últimas décadas, y esto se asocia a una disminución del desempeño reproductivo y al aumento de problemas sanitarios y metabólicos.

El ciclo productivo de una vaca lechera se divide:

- Primer período de vaca seca (3-5 semanas)
- Período preparatorio del parto (últimas 3 semanas de gestación)
- Lactancia temprana (3-5 semanas)
- Lactancia media y final de lactancia (después de pico de producción, los últimos 90-100 días de lactancia)

Cada uno se caracteriza por cuadros hormonales e inmunológicos diferentes, diferente producción, capacidad de movilización de nutrientes y capacidad de consumo. En el último tercio de la gestación existe un requerimiento adicional por el desarrollo placenta-feto (Corbelini, 1999.).

3.8 TRATAMIENTO TÉRMICO

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

El tratamiento térmico o método para pasteurización para el calostro es una práctica común en establos de alta producción y tamaño medio a grande es un proceso tiene como objetivo disminuir la cantidad de microorganismos y eliminar los agentes patógenos que pudieran estar presentes en el calostro.

Estudios muestra que la mayoría del calostro recolectado en granja para tratamiento puede tener una carga bacteriana alta por encima de 100,000 UFC /mL

Se sugiere TT 60 °C por 60 minutos o hasta 120 minutos no afectando el tiempo para este propósito, al contrario la temperatura afecta gravemente la integridad, cantidad y eficacia de la Ig's; ya que se reducen hasta en más de 33 % cuando la temperatura llega a 63 °C (McMartin *et al.*, 2006)

Sin embargo, la combinación de tiempo y temperatura puede de disminuir la cantidad de IgG y afectar la viscosidad del calostro reportando alteraciones significativas que pueden comprometer el proceso de transferencia de inmunidad pasiva a la becerro con resultados muy diversos que no se han podido estandarizar (Elizondo y Heinrichs, 2008). Este proceso reporta la ausencia de patógenos como *Mycobacterium avium o bovis*, *Micoplasma*, *Salmonella*, *E coli*, *Listeria* y Virus de la diarrea viral bovina, después de tratamiento térmico (Godden, *et al.*, 2006);

El proceso de homogenización en leche o calostro previo al tratamiento térmico o pasteurización mejora el proceso hasta un 5 % (Elizondo y Heninrichs, 2008)

La razón es que la dispersión de las células de *Mycobacterium avium* al estar homogenizado en la leche son más susceptibles a tratamiento (Grant *et al.*, 2005).

(McDonald *et al.*, 2005). reportan riesgo en la eliminación de *Mycobacterium avium paratuberculosis* en leche con el proceso de pasteurización en leche a 72 o 73 °C lo que cuestiona, y abre la posibilidad de presencia de este en productos lácteos.

Se sugiere la resistencia de *Mycobacterium avium* o paratuberculosis como más que el *Mycobacterium bovis*, *Salmonella*, *Listeria* y *Coxiella* en leche, lo que se considera como un riesgo mayor a la inocuidad de los productos (Sung y Collins, 1998). Además de brucelosis (Carrisoza, 2104).



Figura 5 Pasteurizador de calostro empleados en los ranchos participantes (Dairy Tech 40 L y Pasteurizadores de Aguascalientes 40 L).

En 2010, se realizó un estudio para determinar la temperatura óptima y el tiempo en que el tratamiento térmico de calostro bovino redujo considerablemente el conteo bacteriano, con el menor cambio de viscosidad y disminución de la concentración de IgG. Para lo cual, se recolectaron muestras de calostro del primer ordeño con una concentración > 50 g de inmunoglobulinas/L (medido por el calostrómetro) de 30 vacas Holstein. Todos los grupos de calostro fueron tratados térmicamente por 0.0, 30, 60 o 90 min a 57, 60 y 63° C en un baño de agua. Las muestras fueron examinadas para viscosidad, IgG1 y concentraciones de IgG2, cuenta de bacteriana en placa estándar, para estafilococos coagulasa negativos, estreptococos ambientales, coliformes, No-coliformes, Gram negativos, *Streptococcus agalactiae*, y cuenta de *Staphylococcus aureus*.

Entre los resultados más importantes, se pudo observar que todos los tratamientos de térmicos redujeron significativamente el conteo de todos los grupos de bacterias en comparación con las muestras de calostro sin tratar.

Sin embargo, el tratamiento térmico a $\geq 60^{\circ} \text{C}$ desnaturalizó al grupo de IgG1, en comparación con el calostro no tratado; sin embargo, niveles de IgG2 en calostro no disminuyeron cuando la temperatura se fijó a $60^{\circ} \text{C} < 60 \text{ min}$ (Elizondo *et al.*, 2010).

La conclusión es que el tratamiento térmico de calostro bovino en 60° C durante 30 o 60 min reduce el conteo bacteriano, y reduce ligeramente la concentración de IgG y no afectó a viscosidad (McMartin *et al.*, 2006).

Existe otro estudio que evalúa y compara el efecto térmico del tratamiento térmico al calostro y a la leche de hospital con un protocolo de tratamiento térmico a 63 °C por 60 minutos comparado con el tratamiento por rayos ultravioleta ligeros, en el cual se concluye que el tratamiento por rayo ultravioleta reduce significativamente el conteo bacteriano con relación al tratamiento térmico, sin embargo, la reducción en la cantidad de IgG es significativamente mayor, por pérdida con los rayos ultravioleta (Teixeira *et al.*, 2013).

El mayor porcentaje de muertes ocurre en las primeras tres semanas de vida y se correlaciona que un nivel por debajo de 10 mg/mL en suero de sangre revisado por refractómetro a 48 horas de vida se considera falla de transferencia pasiva de inmunidad y compromete la viabilidad de la cría (Godden., 2008).

El método de conservación de calostro puede alterar su integridad, calidad y eficacia ya que el calostro refrigerado hasta por 48 horas sufre alteraciones y degradación de IgG paulatinamente, así como el incremento de carga bacteriana, aun con un tratamiento térmico o la adición de algún conservador químico que puede ser contraproducente.

El método de congelamiento disminuye el riesgo de degradación de le calostro y la IgG, sin embargo, el descongelado incrementa gravemente el riesgo de afectación a la integridad de Ig's, por la gran variabilidad de métodos que usan agua caliente para el atemperado de este.

El método más seguro es el baño María y el descongelado por temperatura ambiental si lo permite el clima, ya que el productor se debe asegurar de disminuir e impedir el crecimiento bacteriano en el calostro, o considerar el uso de calostro desecado comercial como alternativa de bioseguridad, y efectiva transferencia pasiva de inmunidad en cantidad de IgG, así como calostro inocuo a la becerria (Godden, 2009).

El manejo es ahora muy importante en establos de mayor tamaño ya que la becerria es retirada de su madre inmediatamente después del parto y trasladada a una instalación para su crianza que debe estar limpia e inocua, así como el lugar en el que nació.

Evitar la contaminación de patógenos e iniciar el procedimiento de transferencia de inmunidad pasiva con éxito (Godden *et al.*, 2012).

Para medir el desempeño de la cría tanto en morbilidad, mortalidad, crecimiento y productividad.

El manejo es ahora muy importante en establos de mayor tamaño ya que la becerria es retirada de su madre inmediatamente después del parto y trasladada a una instalación para su crianza que debe estar limpia e inocua así como el lugar en el que nació, para evitar contaminación de patógenos e iniciar el procedimiento de transferencia pasiva de inmunidad con éxito, por lo cual se requiere de calostro de excelente calidad inmunológica y bajo conteo bacteriano lo que se logra con el uso de calostro tratado térmicamente o el uso de calostro desecado inocuo (Godden *et al.*, 2012) así como medir el desempeño de la cría tanto en morbilidad, mortalidad y crecimiento y peso.



4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1. UBICACIÓN DEL ESTUDIO

El estudio se desarrolló en el Altiplano Central Mexicano, en la Mesa Central, valle de Zacatecas/ Aguascalientes, a 1900 metros sobre el nivel del mar con una precipitación promedio anual de 550 mm con lluvias principalmente de junio a septiembre.

Se seleccionaron dos establos por el método no estadístico de conveniencia, de tamaño y funcionamiento comparable, tecnificados, para producción de leche, con ordeño mecánico automatizado, con carrusel de 40 unidades marca Westfalia, con alta producción, usan inseminación artificial para vacas y vaquillas exclusivamente, cuentan con corrales de tubo negro con sombras de tejaban de lámina a 5 metros de altura de altura en pesebre y cama de composta de estiércol, con producción de leche, lactancia corregida a 305 días de 9,000 kg por vaca, con intervalo entre partos de 14 meses y tasa de preñez de 24%; tasa de desecho de 35% anual.

4.2. POBLACIÓN BAJO ESTUDIO

Para este estudio se convino con los propietarios de las siguientes explotaciones: Rancho 1, ordeña 2,369 vacas Holstein. Rancho 2, ordeña de 1,005 vacas Holstein (tabla 4). Ambos contaban con pasteurizador de calostro y se usó cotidianamente. Ambos contaban con pasteurizador de calostro y se usó cotidianamente. El manejo pre, durante y post parto es similar en los dos ranchos.

Las vacas se secan a los 7 meses de gestación, y permanecen en el corral de secas hasta 21 días antes del parto, con dieta de 14 % de proteína a base de ensilaje de maíz, heno de avena y concentrado para secas 85% materia seca y 15 % de concentrado, se aplica la vacuna virales 6 más 5 leptospiras y clostridium, tres semanas antes del parto se cambian a preparto para preparación con alimentación especial con minerales y concentración de nutrientes dieta preparto 17% proteína, 55% fibra 45% concentrado, se aplica el refuerzo de la vacuna virales 6 más 5 leptospiras y la vacuna RB51 para *Brucella*, al parto son separadas aun corral de para su evaluación y atención de parto, si es necesario

la intervención del personal se autoriza por el encargado en turno, para minimizar la pérdida de becerras nacidas muertas.

La cría es retirada de la madre inmediatamente al nacimiento, se traslada al cunero de transición a jaulas, se pesa y registra el tipo de nacimiento, la hora, asistencia y condiciones de viabilidad. Se suministra el calostro con mamila y biberón, dentro de las dos primeras horas después del parto, se ofrecen dos litros inicialmente, si se los termina, se ofrecen otros dos, por lo general se toman tres litros y se ofrece una tercera toma de dos litros seis horas más tarde. El calostro se colecta cuando las vacas se van a ordeña en el turno siguiente se colecta mediante la misma rutina de ordeño general del establo solo desviando el calostro a jarras de piso.

Se entrega a el encargado, lo evaluó con calostrómetro para clasificar en dos categorías más de 80 grados en densidad como número 1 y menos como número 2 y lo somete a TT, dos lotes por día donde junta el calostro de todas las vacas paridas en ese turno. Se procesa con el protocolo de 60 °C por 60 min, se enfría a 37 °C y se evaluó con el calostrómetro, se clasificó verificando la densidad para etiquetar como categoría correspondiente, y se procedió a envasar a y congelar para su conservación, después se descongela a baño maría a 45°C y se ofrece a la becerria.

Se observó que no existe el procedimiento por escrito, hay diferentes personas involucradas en el proceso, no existe bitácora de control, proceso de limpieza y sanitización no documentado, no encontré termómetros algunas veces, si hay bitácora de entrada de becerras a jaulas con hora de nacimiento, quien atendió el parto y a qué hora.

El riesgo de contaminación por agentes patógenos externos no es controlado ya que el proceso de rutina con dos tratamientos por día que satura las actividades del personal y no existe control por un tercero para cada proceso (ver Tabla 5).

Tabla 5 Comparación de parámetros productivos por rancho durante el estudio (feb-ago. 2016).

	RANCHO 1	RANCHO 2
Vacas Producción	2369	1005
Vacas Secas	378	138
Becerras y Vaquillas	1759	912
Machos	122	435
Producción vaca/lactancia 305 días	9,134	9,533

Relación forraje/concentrado	45/55	55/45
Días en Leche	166	154
Período Seco	73	65
Intervalo entre partos	14.5	14.2
Dosis de concepción	3.8	2.5
Tasa de Preñez %	21	25
Trampas en comedero	+	+
Tejaban en comedero y echadero	+	+
Echaderos con cama común	+	+

4.3. TOMA DE MUESTRAS

Muestras de calostro

El calostro se colectó cuando las vacas se van a ordeña en el turno que les corresponde después del parto siguiendo la misma rutina de ordeño general del establo incluyendo desinfección, limpieza de la teta, secado despunte y colocación de pezoneras. El calostro se desvía a jarras de piso que se usan como contenedor de traslado al área donde se encuentra el equipo para el TT.

El calostro colectado se clasificó en 2 categorías usando un calostrómetro; lectura de más de 80 en densidad como categoría 1.0 y menos de 80 como categoría 2.0. El calostro ya clasificado se sometió a TT, dos lotes por día donde junta el calostro de todas las vacas paridas en ese turno usando el protocolo indicado por el fabricante que corresponde a un tratamiento de 60 °C por 60 minutos, y se enfría a 37 °C. Después del TT el calostro se evaluó con el calostrómetro una vez más para verificar la densidad y etiquetar como categoría correspondiente.

Después de la verificación el calostro se envasó en biberones de 2.0 L de capacidad y se congeló a – 18 °C para su conservación. Antes de ser usado los biberones con calostro congelado se descongelaron en baño maría a 45°C.

Para este estudio se colectaron un total de 336 muestras de calostro a diferentes etapas del proceso y todas las muestras se colectaron en viales estériles de 50 ml que se almacenaron en congelamiento hasta el momento de ser procesados. Las 112 muestras

de la primera etapa del proceso (muestras A) se colectaron directamente de las jarras de piso.

Las muestras de la segunda etapa (muestras B) se colectaron del biberón antes de ser congelados, y las muestras de la última etapa (muestras C) también se colectaron de los biberones al momento de la alimentación de las becerras.

Se evaluó la proteína total de suero de sangre por refractómetro tomando la muestra a las 48 horas de vida.



Figura 6 Almacenamiento de muestras en congelación.

4.4. EVALUACIÓN DE LA CONSERVACION DE LA CONCENTRACION DE INMUNOGLOBULINAS:

A todas las muestras se les identificó y se hicieron pruebas de refractometría en grados Brix, además de la prueba de inmunodifusión radial (RID).

4.4.1. Refractometría

Se utilizó un refractómetro digital para grados Brix, se tomó una muestra homogénea del contenedor de 50 mL, en la cámara de presión negativa para evitar contaminación ambiental y en presencia de mechero para un vial de 1cm, se agito y se procedió a tomar una muestra de 0.05 mL con micropipeta para colocarla en el refractómetro y observar la lectura en grados Brix, se registró la lectura de la muestra identificada por rancho y fecha en la bitácora.

4.4.2. Inmunodifusión Radial

La prueba de inmunodifusión radial (RID, por sus siglas en inglés) es una prueba de laboratorio considerada como el “Estándar de Oro” para la medición funcional de IgG en el calostro, es costosa, con mano de obra intensiva y tarda 18 horas para mostrar resultados (fuente); es una técnica de análisis inmunológico de tipo semi-cuantitativo que detecta la cantidad de anticuerpos en líquidos biológicos, en este caso la concentración de IgG que hay en el calostro bovino, el anticuerpo en suspensión se mezcla con agar impregnado en antígeno ya solidificado.

Con este propósito se hacen pozos o pocillos que contendrán la muestra de calostro, se deja incubar para que la IgG permee por la placa de agar y reaccione con el antígeno presente en la placa después de 18 a 24 horas se observó el precipitado, producto de la reacción entre antígeno e IgG que se muestra en la placa como una línea blanca rodeando los agujeros, el diámetro del círculo es la correlación de la concentración de IgG que tendrá la muestra de calostro (Tizard, 1989), de modo que a mayor diámetro, mayor concentración de este anticuerpo (Hurley *et al.*, 2011).

Inmunodifusión Radial Simple — SRID KITS (Cada placa es de 24 pocillos, 3 pocillos son para sueros de referencia Triple J Farms, USA). Bovino IgG 1 placa Ref. 728411.

Se tomo la muestra de 0.01 ml, con micropipeta de la misma forma que para refractometría del mismo vial en cámara de presión negativa, se estandarizo a dilución 4 a 1 con agua estéril en vial de 1 mL, se colocó la dilución en los pozos del plato agar con antisuero IgG, se conservó a 5° C por 24 horas y después de hizo la lectura de medición de diámetro para calcular la relación de respuesta de acuerdo a tres estándares del kit en los platos para calcular la curva de medición se registró la lectura de la muestra identificada por rancho y fecha en la bitácora.



Figura 7 Ejemplo de respuesta para prueba Inmunodifusión radial

4.5. ESTIMACIÓN DE FALLA DE TRANSFERENCIA DE INMUNIDAD PASIVA:

Se realizó la prueba de refractómetro óptico para estimar la concentración de proteína total en suero de sangre a las 48 h después de la ingestión de calostro.

Se tomaron muestras de sangre mediante tubo con vacío y aguja para cauda a las becerras nacidas y alimentadas con calostro, se realizó la prueba mediante la extracción de suero con micropipeta y colocarla en el refractómetro para observar la lectura en grados Brix se registró la lectura de la muestra identificada por rancho y fecha en la bitácora.

4.6. EVALUACIÓN DE LA CONTAMINACIÓN POR BACTERIAS PATÓGENAS.

Bacteriología

Para determinar si las muestras de calostro estaban contaminadas se usó prueba de turbidez en caldo agar tripticasa.

A todas las muestras de calostro se les extrajo suficiente material congelado para llenar un vial de 1.0 mL usando método de raspado y perforación con equipo de acero inoxidable en cámara de presión positiva.

El contenido del vial se dejó descongelar y se usó como inóculo de los tubos de ensayo con medio caldo agar tripticasa en presencia de mechero.

Después de 24 horas de incubación todas las muestras turbias a inspección visual cualitativa como indicador de crecimiento bacteriano en este medio de cultivo se les dio seguimiento con cultivos sólidos.

La siembra en cultivos solidos se efectuó por inoculación del caldo con asa en presencia de mechero en cámara de presión positiva. Los cultivos solidos empleados en este estudio incluyen agar tripticasa, agar sangre, y agar *Brucella*.

Colonias aisladas en cada medio de cultivo se usaron para conducir tinción Gram, morfología por microscopio y pruebas bioquímicas de oxidasa y peroxidasa para identificación subsecuente de las bacterias aisladas usando estos medios de cultivo.

Las muestras positivas a turbidimetría, identificación microscópica de colonias por crecimiento en agar tripticasa *Brucella*, positivas a color rosado en tinción de Gram, y positivas a peroxidasa, fueron determinadas positivas a *Brucella sp.*

Diez cultivos representativos de las muestras positivas por estos métodos bacteriológicos para identificar *Brucella sp* se enviaron a el laboratorio del Comité de Sanidad Animal de la Laguna para la confirmación de su identificación usando la prueba genética PCR para *Brucella sp.*

Las 10 muestras representativas resultaron positivas al protocolo de PCR diseñado para confirmar aislamiento de bacteriano correspondía a *Brucella sp.*

4.6.1 Caldo Agar Tripticasa

Caldo Tripticasa, es un medio de uso general que se utiliza en procedimientos cualitativos para el cultivo de microorganismos exigentes y no exigentes a partir de una variedad de muestras clínicas y no clínicas.

La presencia de microorganismos en las muestras determinó por turbidimetría, en la prueba de caldo tripticasa, se diluyó e incubó por 24 horas para observar la turbidez por crecimiento bacteriano a inspección visual cualitativa como indicador de crecimiento bacteriano en este medio de cultivo se les dio seguimiento con cultivos sólidos.

Al ser positivo posteriormente se inculo con este caldo en caja de Petri con diferentes medios para asilamiento; Se observó la turbidez de manera cualitativa para proceder al siguiente paso de cultivo toda muestra que se consideró positiva a turbidez.



Figura 8 Ejemplo siembra en agar por dispersión celular. Ejemplo de respuesta para prueba cultivo en caldo tripticasa (Fuente propia)

es el método más usado para identificar y contar bacterias.

Se compone de un caldo de cultivo con microorganismos, por lo que cada célula se dividirá en sus múltiples alrededores para producir colonias separadas en el agar, a cada célula se le llama unidad formadora de colonias (UFC), al pasar las primeras 24 horas de incubación, el número de colonias se reflejará en el número de células UFC originalmente presentes y así cada 24 horas para presuponer el tipo de bacterias en crecimiento.

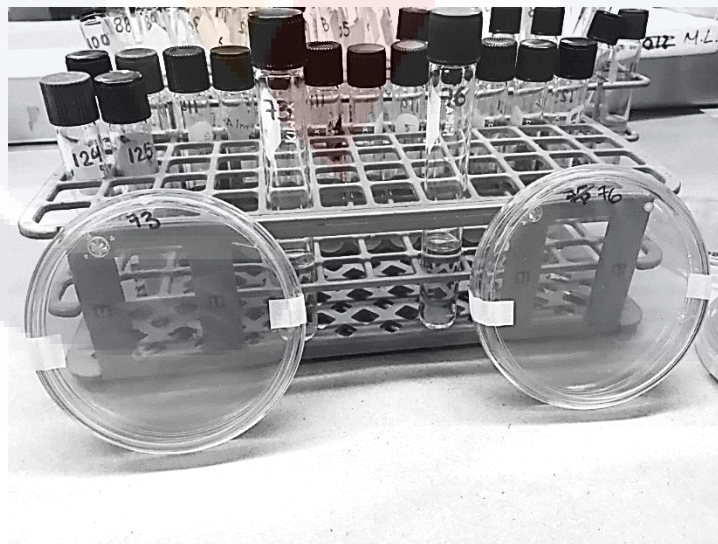


Figura 9 Ejemplo siembra en agar por dispersión celular. Ejemplo de respuesta para prueba cultivo en caldo tripticasa (Fuente propia).

4.6.2. Cultivo siembra agar tripticasa, identificación por tinción Gram e identificación morfológica por microscopio.

Se reprodujeron y aislaron las colonias de patógenos en cultivo todas las muestras positivas a caldo tripticasa con siembra en el medio de cultivo agar tripticasa de soya es un medio de cultivo recomendado para el desarrollo y aislamiento de toda clase de bacterias, grampositivas y gramnegativas aerobias.

Se identificaron por observación colonias con morfología presumible de *Brucella* y se procedió con la técnica de teñido Gram para observar por color rosado las colonias que se tomaron fueron positivas a la identificación por la técnica.

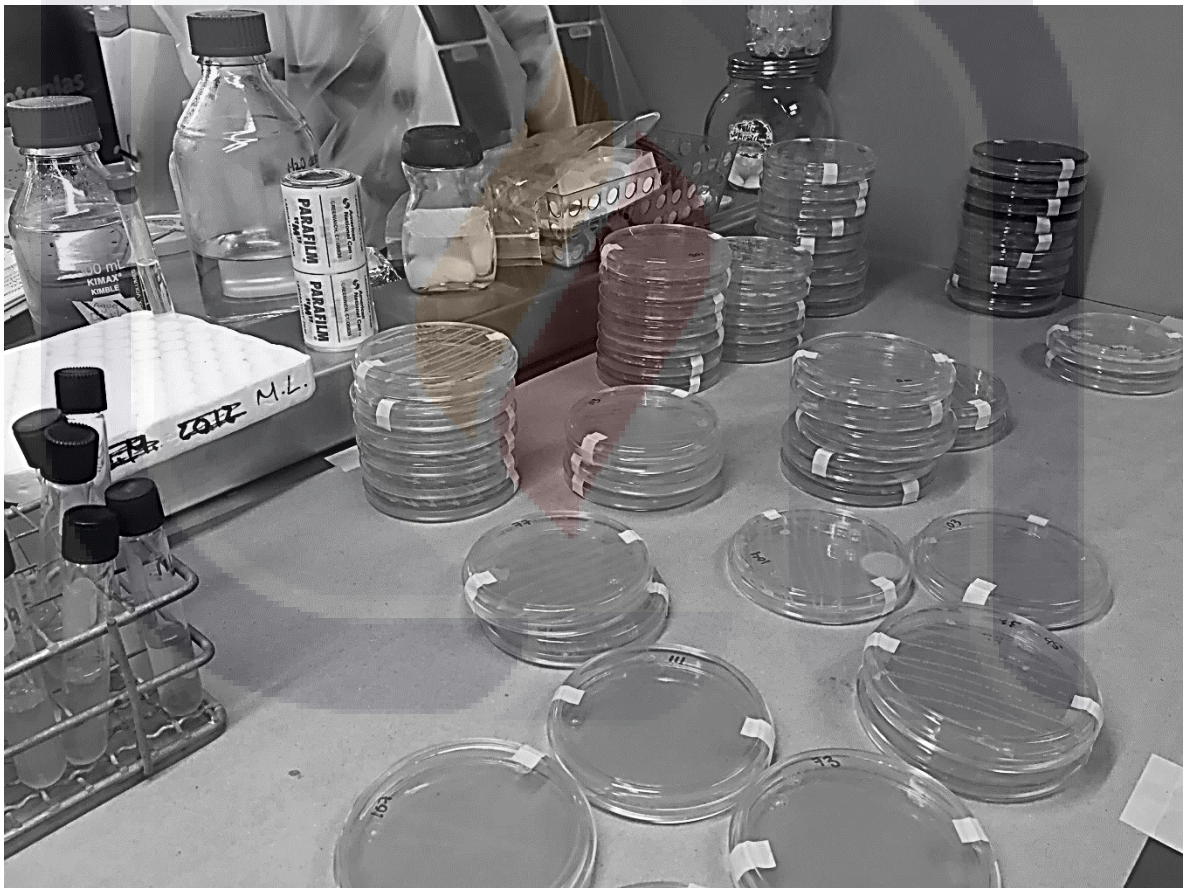


Figura 10 Ejemplo siembra en agar por dispersión celular (Fuente propia).

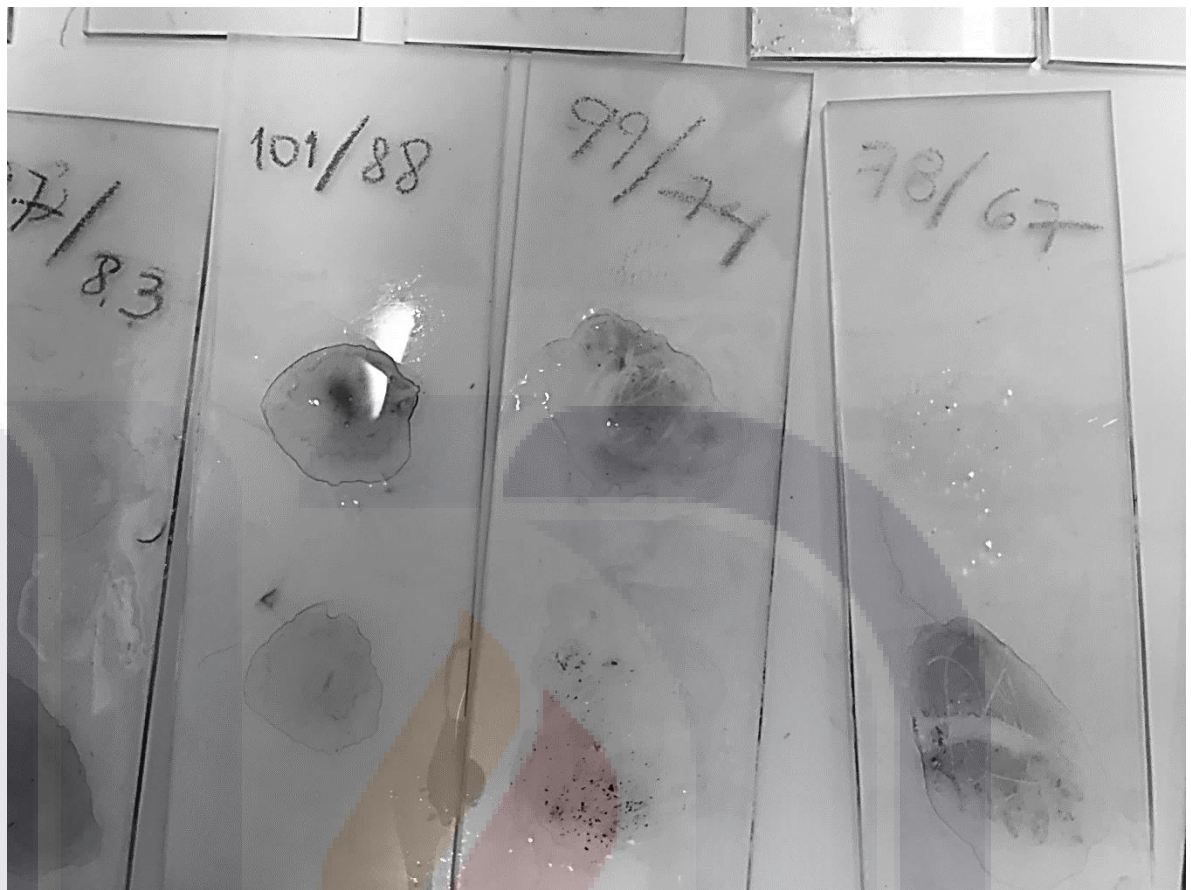


Figura 11 Tinción de Gram para identificación de bacterias por observación microscópica (Fuente propia)

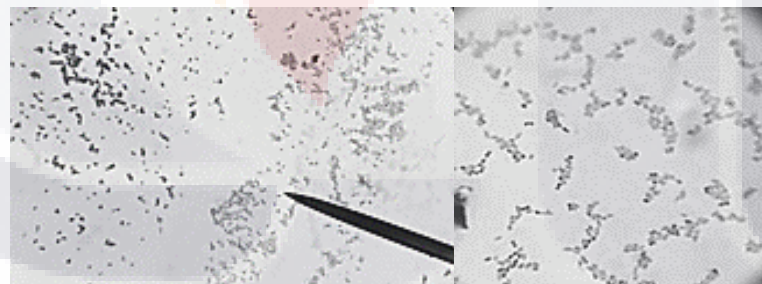


Figura 12 Fotografía de colonias de *Brucella* con tinción de Gram por observación en microscopio 40X, 100X, de izquierda a derecha respectivamente (Fuente propia)

4.6.3. Peroxidasa

La prueba de peroxidasa o catalasa es una enzima que descompone al peróxido de hidrógeno en oxígeno y agua, esta enzima es similar a la estructura de la hemoglobina. Excluyendo al género *Streptococcus* y algunos otros la mayoría de las bacterias aerobias y anaerobias facultativas tienen catalasa.

La base de esta prueba es demostrar la presencia de la enzima catalasa, colocando 2 ó 3 gotas de solución de peróxido al cultivo.

El resultado es positivo si en la colonia hay efervescencia que corresponde a la reacción de peróxido de hidrogeno, con la catalasa y liberación de oxígeno, Catalasa (+): *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas sp.* Catalasa (-): *Streptococcus spp.*



Figura 13 Ejemplo prueba Catalasa positiva Gram –

4.6.4. Oxidasa

La prueba de oxidasa: se utiliza para la identificación de bacterias Gram (-); mediante la detección de la enzima oxidasa.

La reacción de la oxidasa se debe a la presencia del sistema de citocromo-oxidasa, la cual activa citocromos reducidos por oxígeno molecular, por la transferencia de un aceptor al estado terminal del sistema de transferencia de electrones.

El sistema de citocromos está generalmente presente en organismos aeróbicos. Un resultado positivo a la oxidasa consiste en una serie de reacciones en las cuales un componente auto-oxidable del sistema de citocromo es al final catalizado.

Utilizando un tubo capilar con tetrametil-p-phenylendiamina al 1%, se adiciona una pequeña cantidad a un cultivo bacteriano colocado sobre un papel filtro y obtenemos las siguientes reacciones: una reacción positiva (presencia de oxidasa) se indica por la apariencia de un color púrpura oscuro en el papel, en menos de 10 segundos; al contrario, una reacción negativa, que consiste en una ausencia de color púrpura, indica según los ejemplos:

Oxidasa (+): *Pasteurella multocida*

Oxidasa (-): *Escherichia coli*

4.6.5. PCR

Se realizó la prueba para *Brucella* genérico; por la prueba de reacción en cadena de la polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés: Polymerase Chain Reaction), que es una técnica de biología molecular desarrollada en 1986 por Kary Mullis.

La prueba PCR es un método adicional de detección e identificación de especies de *Brucella*. Pese al alto grado de homología del ADN dentro del género *Brucella*, se han desarrollado varios métodos que permiten, hasta cierto punto, la diferenciación entre especies y algunos de sus biovariedades.

PCR, el análisis del polimorfismo de fragmentos de restricción (RFLP) y la hibridación tipo Southern. Se ha desarrollado también una electroforesis en campo pulsante que permite la diferenciación entre varias especies de *Brucella*. Mediante el empleo de PCR puede biotipificarse *Brucella* y pueden diferenciarse las cepas vacunales, pero PCR solo ha tenido una validación limitada para el diagnóstico primario.

El medio de cultivo agar tripticasa de soya es un medio de cultivo recomendado para el desarrollo y aislamiento de toda clase de bacterias, grampositivas y gramnegativas aerobias.

4.7. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

El modelo estadístico que se utilizó fue un diseño completamente al azar y fue el siguiente:

Tabla 6 Análisis Estadístico

$$Y_j = \mu + T_j + \varepsilon_j \quad j = 1, 2, \dots, t$$

Donde:

Y_j = variable respuesta

μ = media general de respuesta

T_j = efecto del tratamiento sobre la variable

ε_j = error aleatorio

Tratamientos (3): Calostro fresco (CF), Calostro tratado térmicamente (CT), Calostro al suministro (CS)

Ranchos (2) Rancho 1 (1) y Rancho 2 (2)

Los datos de todas las variables cuantitativas que se obtuvieron en los muestreos realizados fueron capturados y ordenados en una hoja electrónica de Microsoft Excel® para facilitar su análisis. Posteriormente, los datos se sometieron a un análisis de varianza (ANDEVA).

El cálculo de la potencia necesaria para determinar la n de la prueba basada en la variación detectada en estudios similares (Chamorro, 2015), se estima en un total de 90 muestras en dos ranchos, es suficiente para que el resultado sea estadísticamente confiable en más de 95%.

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se estimó la concentración de Ig's por refractometría e inmunodifusión radial. Se estimó la TP mediante la concentración de proteínas séricas de los becerros alimentados con calostro, 48 h después de la primera alimentación. Se confirmó *in vitro* que el TT tuvo la capacidad de preservar las Ig's y de disminuir la contaminación bacteriana, ya que todos los géneros de *Streptococcus*, *Staphylococcus*, *Brucella*, enterobacterias y levaduras presentes fueron eliminados (60 min 60°C). Se determinó la presencia de microorganismos patógenos mediante cultivo, aislamiento e identificación microscópica y molecular.

En tabla 7 se pueden observar los resultados de la refractometría y la inmunodifusión radial fueron en promedio 18.9 grados Brix y 47.7 g/L, respectivamente, no se registraron diferencias significativas entre los diferentes tratamientos en el proceso térmico del calostro ($p>0.05$).

Tabla 7 Estimación de la concentración de inmunoglobulinas mediante refractometría en (grados Brix) e inmunodifusión radial (g/L) en calostro bovino fresco, tratado y suministrado.

<i>Tipo</i>	<i>n</i>	<i>Promedio</i>	<i>Error Estándar</i>
<i>REFRACTOMETRIA</i>			
Fresco	112	19.1 ^a	0.26
Tratado	112	19.1 ^a	0.23
Suministrado	112	18.6 ^a	0.29
Total	336	18.9	0.15
<i>INMUNODIFUSIÓN RADIAL</i>			
Fresco	112	50.6 ^a	3.0
Tratado	112	46.3 ^a	2.4
Suministrado	112	46.3 ^a	2.6
Total	336	47.7	1.6

^a medias de inmunoglobulinas por tipo de método de determinación con la misma literal no presentaron diferencias estadísticas significativas (Tukey $P>0.05$).

En la Tabla 7 y en la Figura 8, se observó que la evaluación de diámetro en la prueba de inmunodifusión radial no existe diferencia significativa entre los diferentes tratamientos en el proceso de tratamiento térmico de calostro relacionado con la concentración de Ig's, (ver Figura 14).

Lo anterior sugiere que el TT no alteró la concentración de inmunoglobulinas como se demuestra en los resultados en la prueba de inmunodifusión radial (Gelsinger *et al.*, 2015).

Estudios compararon la eficacia de la prueba IDR con la prueba de E.L.I.S.A. y recomiendan el uso de IDR por conveniencia por efectividad, seguridad y sencillez para medir confiablemente la concentración de Ig's para calostro.

Al comparar los resultados en el calostro fresco con media de 50.6 g/L, 46.3 g/L para calostro tratado y 46.3 g/L para calostro suministrado en este estudio (Gelsinger *et al.*, 2015).

La concentración de Ig's fue aceptable para producir efectiva para la transferencia de inmunidad pasiva, como se puede comparar con resultados similares en el estudio de (Godden *et al.*, 2006) así mismo lo menciona (Donahue *et al.*, 2012) aunque la mayor disminución se encontro en el calostro de mejor calidad (50–59.9 mg de IgG/mL).

Los ranchos que tienen un proceso de control y monitoreo de la calidad del calostro en tratamiento identifican las variaciones en la calidad para evitar el uso de calostro pobre en la concentración de Ig's después de ser tratado térmicamente (Kehoe *et al.*, 2007).

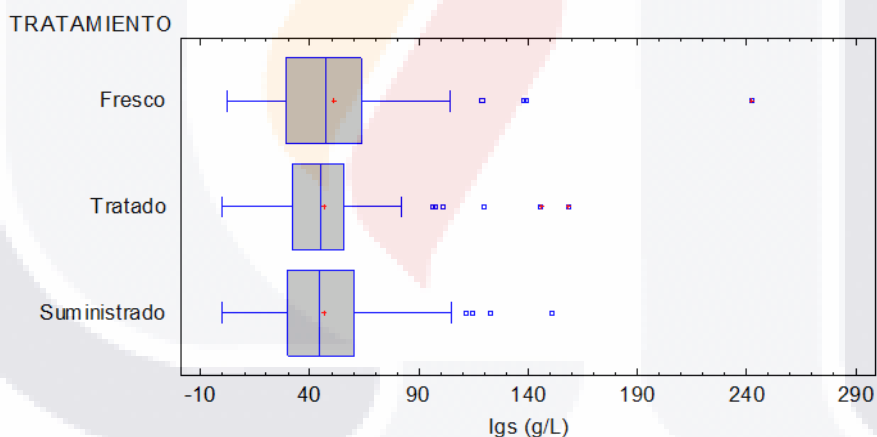


Figura 14. Grafica para Estimación de la concentración de inmunoglobulinas mediante refractometría en (grados Brix) e inmunodifusión radial (g/L) en calostro bovino fresco, tratado y suministrado.

Estimación de la concentración de inmunoglobulinas por como una proporción de los sólidos totales evaluado mediante inmunodifusión radial en el calostro fresco, tratado y suministrado. Se muestra la media (+), mediana (línea central) y rangos intercuartílicos (caja y bigotes), así como puntos aberrantes.

En la Figura 14 se puede observar claramente la media los rangos y las muestras fuera de parámetro que se observaron en el estudio, similares a estudios anteriores como lo demuestra (Donahue *et al.*, 2012).

En la tabla 8 (ver Figura 15) se presentan los resultados de la valoración de la concentración de proteína total en suero de sangre a las 48 h postconsumo de calostro en estos dos ranchos fue en promedio de 5.4 grados Brix, escala de 5.2 a 5.5 referenciada por (McGuirk, 2004), manifestando una diferencia significativa entre los ranchos (ver Tabla 8).

Lo que sugiere que, desde el inicio, los dos ranchos fueron diferentes en la producción integral y de efecto del calostro.

El éxito para la transferencia de inmunidad pasiva lo podemos relacionar con la medición de proteína total en sangre a 48 h post suministro de calostro en el recién nacido (Donovan *et al.*, 1986).

La eficacia en la transferencia de inmunidad pasiva de IgG mejora el rendimiento de en el desarrollo integral de la becerro (Godden *et al.*, 2009).

La máxima capacidad de expresión genética para la producción de leche o carne de los animales inicia con el consumo de calostro inocuo y de calidad adecuada para que la concentración de anticuerpos sea absorbida en el intestino y se transfiera pasivamente la inmunidad (Elizondo *et al.*, 2010).

La eficacia en la transferencia de inmunidad pasiva se correlaciona con la lectura de proteína total con IgG en suero con refractómetro óptico o digital en grados Brix, (Deelen *et al.*, 2014)

Tabla 8 Estimación de la absorción para transferencia de inmunidad pasiva por refractometría de proteína total en suero de sangre a 48 h por rancho (g/dL).

Rancho	Muestras (n)	IgG en Calostro g/L(DE)	Proteína Sérica Total g/dL (DE)
1	231	48.1 ^a (24.6)	4.9 ^a (0.91)
2	105	46.8 ^a (36.0)	6.4 ^b (0.71)
Total	336	47.7 (28.6)	5.4 (1.10)

^{ab} Medias con literal diferente muestran diferencias estadísticamente significativas.

En la tabla 9 se muestran los resultados de la tasa de morbilidad en becerras lactantes en los establos en estudio.

Se observó que la morbilidad en becerras en periodo lactante tuvo una diferencia significativa por rancho.

El manejo de cada rancho puede variar e influir en las diferencias de morbilidad, sin embargo, la absorción en la transferencia de inmunidad pasiva muestra una diferencia significativa que puede influir directamente con la tasa de morbilidad en cada rancho.

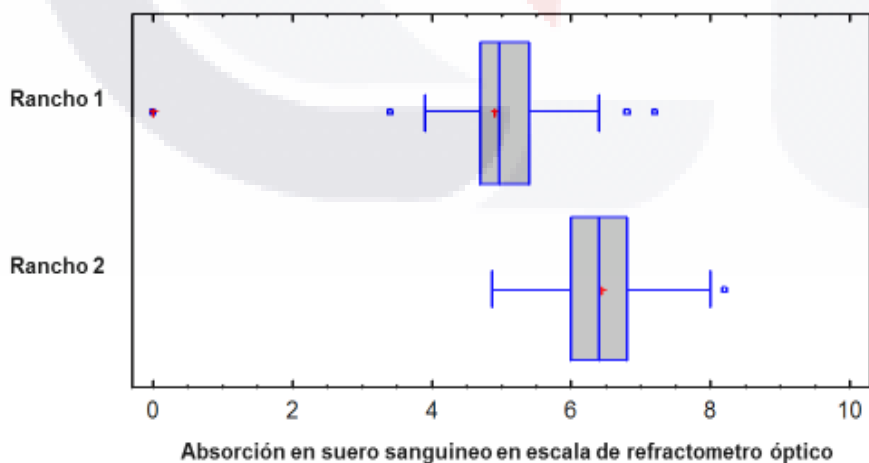
Se reporta un estudio en que las becerras enfermas tuvieron una correlación con 62 % con falla de transferencia de inmunidad pasiva, el punto de corte para determinarla fue de < 1000 mg/dL de concentración de IgG por lo que la determinación de la concentración de IgG en el calostro debe ser mucho más precisa para prevenir la falla de transferencia de inmunidad pasiva (Gilles Fecteau, 2013).

Tabla 9 Estimación de la absorción para transferencia de inmunidad pasiva por refractometría de proteína total en suero de sangre a 48 h por rancho (g/dL).

Rancho	Muestras (n)	IgG en Calostro g/becerra (DE)	IgG en Suero g/L becerrea (DE)	Absorción IgG de Transferencia %	Falla de Transferencia % (< 5.0 g/dL, 48 h)
1	231	145 ^a (72.4)	10.13 ^a (.14)	35.12 ^A	50.4 ^A
2	105	140 ^a (108)	12.9 ^b (.11)	67.46 ^B	9.8 ^B
Total	336	143 (85.1)	10.9 (.20)	45.22	47.8

^{ab} Medias con literal diferente muestran diferencias estadísticamente significativas.

^{AB} Medias con literal diferente muestran diferencias estadísticamente significativas a la prueba de Xi cuadrada.



g/dL

Figura 15 Concentración sérica estimada de Inmunoglobulinas en becerras 48 horas postconsumo de calostro en dos establos (g/100 mL)
Se muestra la media (+), mediana (línea central) y rangos intercuartílicos (caja y bigotes), así como puntos aberrantes.

Tasa de morbilidad y mortandad

Se explica la diferente tasa de morbilidad y mortalidad observada entre ranchos como lo menciona también (Kehoe *et al.*, 2007) en Pensilvania, se asocia con la medición de proteína total en suero de sangre registrada entre ranchos, así como la tasa de mortandad asociada también a la medición diferente y significativa como consecuencia de éxito o falla de transferencia pasiva de inmunidad en las becerras también en el estudio publicado por (Patel *et al.*, 2014).

Rancho 1 con promedio de 50.8 y rancho 2 con 33.1, al asociar el resultado con la medición de proteína total en suero de sangre el rancho 1 promedia 4.9 g/dL.

Rancho 2 con 6.4 g/dL, lo que podemos relacionar a que la concentración de Ig's en el calostro ofrecido fue diferente y que existen diferencias en la forma o condiciones de suministro de calostro por condiciones ambientales, de parto, el método de alimentación y el tiempo de suministro, se han observado estos mismos resultados como lo menciona (Donovan, *et al.*, 1986 ;).

El volumen de 3.0-4.0 L de calostro que es aproximadamente el 10% del peso vivo de la becerro debe ser suministrado antes de las 2 h y no después de las 6 h de nacimiento, el calostro debe contener >50 g/L de inmunoglobulinas (Ig) con una cuenta bacteriana <100,000 UFC/mL.

El consumo óptimo no se debe asumir por amamantamiento directo de la vaca, se recomienda suministrarlo con medidas de volumen y estimando la calidad del calostro.

Al mezclar calostro de varias vacas reduce la calidad del lote e incrementa el riesgo de transferencia de enfermedades.

Las becerras que no reciben la concentración mínima indispensable de IgG para la supervivencia de (<10g/L of IgG o <50g/L de proteína total medida en suero sanguíneo a 48h) reportan una disminución de habilidad para contrarrestar el desafío de enfermedades ambientales, patógenos por contacto y mala higiene; se incrementa el riesgo de muerte al no ser eficaces para manejar el stress calórico o frío y reducir el consumo de alimento (Patel *et al.*, 2014).

Tabla 10 Diarrea en periodo de lactante en becerras por rancho (%) (periodo lactante 60 días)

<i>Diarreas reportadas por rancho</i>	<i>n</i>	<i>Promedio</i>	<i>Error Estándar</i>
Rancho 1	231	50.8^a	1.41
Rancho 2	105	33.1^b	1.60
Total	336	45.3	1.18

ab diferencia estadísticamente significativa; valor $P < 0.05$, la media de morbilidad entre un nivel de rancho y otro, con un nivel del 95.0% de confianza.

En la tabla 11 se muestra la tasa de mortalidad se observó que la mortalidad en becerras en periodo lactante tuvo una diferencia significativa por rancho. ($P < 0.05$).

El manejo de cada rancho puede variar e influir en las diferencias de mortalidad, sin embargo, la absorción en la transferencia de inmunidad pasiva muestra una diferencia significativa que puede influir directamente con la tasa de mortalidad en cada rancho.

El éxito o fracaso en la crianza de la becerro depende de la calidad del calostro, la absorción de inmunidad pasiva y la presencia de microorganismos que por su cantidad o tipo pueda incrementar la morbilidad y la mortalidad en los ranchos. Se observó que el rancho 1 promedió 18.2 % de mortandad y el rancho 2 promedió 5.7%.

La falla en la transferencia de inmunidad pasiva se asocia con la medición de proteína total en suero de sangre y la morbilidad que fue también significativamente diferente entre ranchos que se relaciona igualmente (Kehoe *et al.*, 2011).

La tasa de 18.2% es muy alta en comparación de la tasa promedio en ranchos tecnificados como lo menciona Roth (2009) en establos de Norteamérica y (Fecteau, 2002) en Quebec.

Podemos asociar la tasa de mortandad a enfermedades como diarrea y neumonía (Besser, 1985.), con el volumen de calostro y concentración de IgG consumida, el momento de alimentación de la becerro el tipo de parto, difíciles, con sufrimiento fetal y distocia (García, *et al.*, 2009), las condiciones ambientales estresantes y la técnica de alimentación, mamando, con biberón y con sonda esofágica (Hurley *et al.*, 2011).

Así mismo como la época del parto, en invierno se observó mejor concentración de IgG (Soheila *et al.*, 2017)

La cantidad de calostro (Barrington *et al.*, 2002), demuestra igualmente que la calidad, cantidad e inocuidad mejoran las tasas de morbilidad y mortalidad de becerras en establos productores de leche.

Tabla 11 Mortalidad en periodo de lactante en becerras por rancho (%) en el periodo de 6 meses del estudio.

<i>Mortandad por rancho</i>	<i>n</i>	<i>Promedio</i>	<i>Error Estándar</i>
Rancho 1	231	18.2*	1.05
Rancho 2	105	5.7*	0.38
Total	336	14.4	0.79

* diferencia estadísticamente significativa; el valor $P < 0.05$, entre la media de mortalidad entre un nivel de rancho y otro.

Contaminación por microorganismos

En la tabla 11 se integró la prevalencia de microorganismos. Se observó el número de muestras de calostro positivo a levaduras, enterobacterias, estreptococos y *Brucella* por presencia de estos agentes en calostro fresco, tratado y suministrado. Así como la frecuencia de las muestras positivas a cada patógeno, en cada uno de los tratamientos del calostro. Se muestra que las clasificaciones de fila y columna son independientes y en casos particulares pudieran no tener relación con su valor de tratamiento, con una confianza del 95% (Chi-cuadrada $P < 0.05$).

Los resultados demuestran presencia de microorganismos patógenos diversos (tabla 11), el número de muestras positivas a diferentes tipos de microorganismos es muy alto, lo que significa que el TT no fue efectivo o existen muchos riesgos de contaminación en el proceso de colección, tratamiento, almacenamiento y suministro a las becerras.

Esto no es nuevo (Donahue *et al.*, 2012) en el artículo sobre tratamiento de calostro en granjas comerciales en Estados Unidos, que dice que, bajo condiciones controladas en el proceso térmico, reduce la concentración de microorganismos patógenos, pero no los elimina, si la concentración inicial es alta disminuye una proporción exponencial de 10 a la 3 y conserva o disminuye no significativamente la cantidad de Ig's.

Sin embargo, (Gulliksen *et al.*, 2008.) explica la variación del TT al no identificar los puntos de control para garantizar la calidad e inocuidad del calostro y reducir el riesgo de

trasmisión de enfermedades como lo describe (Godden *et al.*, 2006) al mostrar la resistencia de patógenos al TT en diferentes niveles de tiempo y temperatura como MAP (ver Tabla 2).

La presencia de estafilococos áureos permite la posible oportunidad de infección latente cuando la becerria haga su primer parto y afecte la productividad y rentabilidad.

La principal vía de entrada de *Brucella* es la oral, por la ingestión de alimento o agua contaminados por secreciones o restos de abortos de vacas infectadas, o bien por el lamido de las secreciones vaginales, los genitales, los fetos abortados y los becerros recién nacidos de vacas infectadas. (Díaz, 2013)

Al encontrar también presencia de *Brucella* en el calostro 18% de las muestras en el estudio, en los diferentes tratamientos, fresco, tratado y suministrado, explica la posibilidad de trasmisión vertical de la enfermedad a las becerras en los ranchos donde la prevalencia de *Brucella* es alta, podemos observar que no disminuye significativamente al transcurso de los años, este mismo caso lo describe (Carrisoza, 2104), en establos en Querétaro, México, así como lo trata de relacionar (Melendez *et al.*, 2010) en establos del Altiplano Central Mexicano.

El protocolo de TT de 60 °C por 60 min es seguro para eliminar la mayoría de los microorganismos patógenos presentes en el calostro como lo demuestra (Godden *et al.*, 2006), aunque se observa en los resultados que no siempre es seguro para eliminar *Mycobacterium avium*, aun en condiciones de laboratorio. Después de 7 años de seguimiento a las becerras alimentadas con calostro tratado y crudo se observó que no hubo diferencia significativamente en la prevalencia de paratuberculosis en estos animales (Godden *et al.*, 2015).

Con el éxito o falla de transferencia pasiva de inmunidad en las becerras, también existen indicios que pueden relacionar la concentración de Ig's en el calostro ofrecido y factores que pueden afectar como, la forma o condiciones de suministro de calostro, condiciones ambientales, de parto, el método de alimentación y el tiempo de suministro, así como el proceso de alimentación hasta el destete (Meale *et al.*, 2017).

Para los establos mexicanos es muy importante erradicar la brucelosis, tuberculosis y paratuberculosis (Cisneros *et al.*, 2012).

Lograr en el Altiplano central y en el estado de Aguascalientes un estatus sanitario equivalente al requisito mundial sanitario promueve la oferta de productos de origen animal al mercado mundial, además de mejorar la productividad de los establos en México

(Melendez *et al.*, 2010) al relacionar los abortos y sus causas y la baja productividad en establos.

Tabla 12 Cambio en la prevalencia (Prev) de microorganismos patógenos detectada en muestras de calostro fresco, tratado y suministrado.

Microorganismos patógenos	Fresco			Tratado			Cambio	Suministrado			Cambio
	(-)	(+)	Prev (%)	(-)	(+)	Prev (%)	(%)	(-)	(+)	Prev (%)	(%)
Levaduras	107	5*	4.5	99	13*	11.6	160	104	8*	7.1	60.0
Estreptococos	73	39*	34.8	79	33*	29.5	-15.4	82	30*	26.8	-23.1
Enterobacterias	110	2*	1.8	112	0*	0.0	-100	109	3*	2.7	50.0
Brucella	92	20*	17.9	93	19*	17.0	-5.0	92	20*	17.9	0.0

(-) Muestra sin crecimiento microbiano; (+) Muestra con crecimiento microbiano; P Prevalencia: +/total *100. Cambio: P en calostro tratado / P calostro fresco * 100; números positivos indican contaminación en el proceso.

*Número de muestras positivas a Levaduras, Enterobacterias, Estreptococos y BR (Brucella) muestra con qué frecuencia se presentan los 2 valores de agentes con cada uno de los 3 valores de TRATAMIENTO. Las clasificaciones de fila y columna son independientes con un nivel de confianza del 95.0%. Por lo tanto, el valor observado de bacterias para un caso en particular pudiera no tener relación con su valor en TRATAMIENTO (Chi-Cuadrada P<0.05).

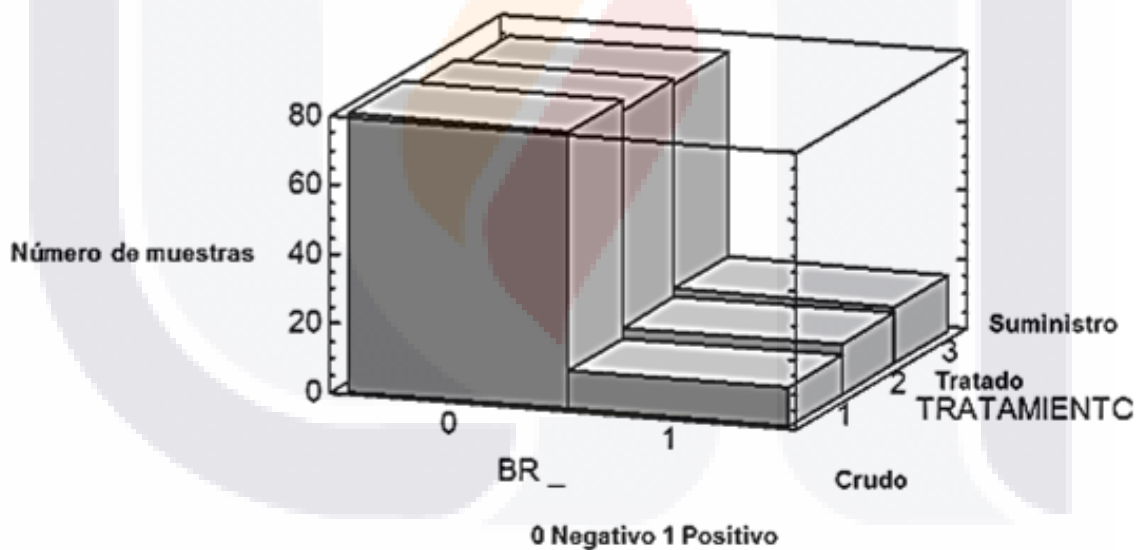


Figura 16 Número de muestras positivas a Brucella (BR) en calostro crudo (Fresco), TT y Suministrado (biberón).

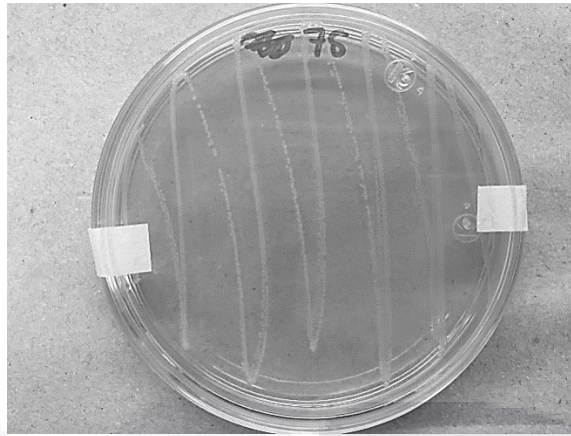


Figura 17 Cultivo agar Brucella, muestra 76 crecimiento colonias (Fuente propia)



Figura 18 Fotografía 2 de colonias de Brucella con tinción de Gram por observación en microscopio compuesto y confirmación por PCR (Fuente propia).

Se observaron variaciones e inconsistencias en el control de factores de riesgo dentro del proceso de obtención y suministro de calostro en los dos ranchos como:

- la calidad de calostro,
- la hora de alimentación,
- distocias,
- sufrimiento fetal,
- volumen ingerido,
- vacas con mastitis al parto,
- parideros comunes sucios,

- no se retiraron las becerras naciendo y tuvieron contacto con su madre y otras vacas y becerras,
- presencia de fauna nociva,
- variación de la temperatura y tiempo de tratamiento térmico,
- uso de los mismos recipientes para calostro fresco y tratado,
- variación en la calidad de limpieza de equipo, biberones y mamilas,
- falta de registros completos y ninguno lleva bitácora de temperaturas y servicios al equipo,
- uso de la carretilla de transporte de becerras para diferentes usos,
- no se desinfectó,
- tratamiento diferente al indicado para partos por la noche
- variación de protocolo para personal de relevo no capacitado.

Los incentivos para que establos mexicanos sean libres de brucelosis han intensificado las iniciativas que se están implementando en las lecherías para reducir la prevalencia y eventualmente erradicar la enfermedad en el hato.

Ha sido bien documentado (Díaz, 2013) que la contaminación de calostro con *B. abortus* puede ser una fuente importante de transmisión a becerras recién nacidas por lo cual muchos establos lecheros han establecido protocolos para efectuar TT que ayuden mitigar este riesgo. Desafortunadamente no existen pruebas de campo para certificar la inocuidad del calostro después del TT (únicamente pruebas tradicionales para bacteriología en laboratorio) y en algunos establos existe la percepción de que la implementación de esta práctica de manejo no ha tenido impacto en disminuir la prevalencia de brucelosis en el hato.

En este estudio se realizó un survey de riesgo de contaminación por patógenos durante 3 diferentes etapas del manejo de calostro en condiciones de campo en 2 ranchos y nuestros resultados indican que en condiciones de campo la implementación de prácticas de manejo de tratamiento térmico de calostro bovino es insuficiente para reducir el riesgo de transmisión de *Brucella sp* de adultos a becerras de remplazo.

En este estudio de sondeo encontramos que tanto el calostro fresco, así como el calostro después del TT puede estar contaminado con *Brucella sp*, y esta observación puede explicar la observación en campo de que la prevalencia de brucelosis en ranchos no

disminuye significativamente al transcurso de los años, a pesar de la implementación de prácticas de TT.

Independientemente, de que el TT en condiciones de campo no parece ser efectivo en eliminar *Brucella sp*, existen muchos riesgos de contaminación en el proceso de colección, tratamiento, almacenamiento y suministro de calostro a las becerras.

En granjas comerciales en Estados Unidos, y bajo condiciones controladas en el proceso de TT reduce la concentración de microorganismos patógenos y conserva la cantidad de Ig's. (Donahue *et al.*, 2012).

Experimentalmente se demostró que el protocolo de TT de 60 °C por 60 min es seguro para eliminar la mayoría de los microorganismos patógenos presentes en el calostro como lo demuestra (Godden *et al.*, 2006), aunque se observa en los resultados que no siempre es seguro para eliminar *Mycobacterium avium*, aun en condiciones de laboratorio. En condiciones de campo se demostró, después de 7 años de seguimiento a las becerras alimentadas con calostro crudo y con TT 60 grados centígrados por 60 min, que el protocolo de TT no se observó una reducción significativa en la prevalencia de paratuberculosis en estos animales (Godden *et al.*, 2015).

El hecho de que el número de muestras contaminadas con *Brucella sp* aumentó después del TT en Rancho 2 sugiere que en condiciones de campo pueden existir oportunidades de contaminación posteriores al TT, por ejemplo, variación en la calidad de limpieza de equipo, usado durante el proceso de transporte, clasificación y envase del calostro indicando qué medidas de higiene y bioseguridad tienen que ser implementadas para evitar contaminaciones secundarias.

6. CONCLUSIÓN

Al evaluar la eficacia de Tratamiento Térmico en condiciones de campo, se observó que fue eficaz para conservar la concentración de inmunoglobulinas en el calostro bovino empleado en diferentes establos, ya que solamente se detectó un descenso marginal de IgG debido a tratamiento.

Sin embargo, existió variación en la falla de transferencia de inmunidad pasiva entre ranchos por manejo, al encontrar diferencias en la forma de alimentación, tiempo, condiciones ambientales y la cantidad consumida, evidenciado por la tasa de morbilidad y mortandad, lo que sugiere que, en condiciones de campo, pueden existir oportunidades de contaminación posteriores al TT.

Este estudio de sondeo claramente indica que en condiciones reales existe un riesgo de que el TT implementado para reducir el riesgo de transmisión de brucelosis en el hato no está cumpliendo el objetivo deseado y que el manejo adicional necesario para implementar esta práctica de bioseguridad (clasificación, envasado, descongelación) puede aumentar el riesgo de contaminación y transmisión vertical a la becerria.

BIBLIOGRAFÍA

- Barrington GM, Gay JM, Evermann JF. (2002). Biosecurity for neonatal gastrointestinal diseases. *Veterinary Clinics Food Animal Practice*, 18, 7–34.
- Baumrucke, C. R., Rahel S Zbinden, H. A., Remmelink, G. J., Kemp, B., Knegsel, A. (2014). Continuous milking of dairy cows disrupts timing of peak IgG concentration appearance in mammary secretions. *Journal of Dairy Research*, 81 403–409.
- Besser TE, Gay CC, Pritchett L. (1991). Comparison of three methods of feeding colostrum to dairy calves. *Journal of the American Veterinary Medical Association*. 198 419–422.
- Besser TE, Gay CC, (1985.). Septicemic Colibacillosis and Failure of Passive Transfer of Colostral Immunoglobulin in Calves. *Veterinary Clinics Food Animal Practice*, 1: 445-459.
- Campos, M, y Godson, D. (2003). The effectiveness and limitations of immune memory: understanding protective immune responses. *International Journal for Parasitology* 33, 655–661.
- Carrisoza, M. D. (2104). Transmisión de *Brucella abortus* en becerras menores de tres meses diagnosticadas por medio de las pruebas de tarjeta e inmunodifusión radial en dos hatos lecheros del estado de Querétaro. Número especial *Veterinaria México.*, 2014 11.
- D. Cavestany, J. E. Blanc, M. Kulcsar, G. Uriarte, P. Chilibroste, A. Meikle, H. Febel, A. Ferraris and E. Krall. (2005). Studies of the Transition Cow Under a Pasture-based Milk Production System. *Journal Veterinary Medicine*, A 52, 1–7.
- Cisneros, L. F., Valdivia, A., Waldrup, K., Díaz, E., Martínez, A., Cruz, C., & Ortiz, R. (2012). Surveillance for mycobacterium bovis transmission from domestic cattle to wild ruminants in a Mexican wildlife-livestock interface area. *American Journal of Veterinary Research*, 73 (10)- 1617-1625. doi:10.2460/ajvr.73.10.1617
- Corbelini, C. N. (1997). Influencia de la nutrición en las enfermedades de la producción de las vacas lecheras en transición. 1st International Conference on Emerging Zoonoses Jerusalem, Israel. Vol. 3, No. 2, April–June 1997
- Davis, C., y Dreckley, J. (1998). The development, nutrition, and management of the young calf. Iowa State` University Press. 188-189.

- Deelen, S., Ollivet, T. L., Haines, D. M., & Leslie, a. K. (2014). Evaluation of a Brix refractometer to estimate serum immunoglobulin G concentration in neonatal dairy calves. *Journal of Dairy Science*, 97 :3838–3844.
- Díaz, Aparacio, E. (2013). Epidemiología de la brucelosis causada por *Brucella melitensis*, *Brucella suis* y *Brucella abortus* en animales domésticos. *Revue scientifique et technique (International Office of Epizootics)* 32 (1), 43-51.
- Donahue M., Godden, S. M., Bey, R., Wells, S., Oakes, J. M., Sreevatsan, S., Fetrow, J. (2012). Heat treatment of colostrum on commercial dairy farms. *Journal of Dairy Science*, 95, 2697–2702.
- Donovan, G. A., I, Badinga R. J. Collier, C. J. Wilcox, and r. K. Braun (1986 ;). Factors influencing passive transfer in dairy calves. *Journal of Dairy Science*, 69:754-9.
- Elizondo-Salazar, J. A, y Heinrichs, A. J., (2008). Review: Heat Treating Bovine. *The Professional Animal Scientist* 24, 530–538.
- Elizondo- Salazar, J. A., Jayarao, M., B., y Heinrichs, A, J. (2010). Effect of heat treatment of bovine colostrum on bacterial counts, viscosity, and immunoglobulin G Concentration. *The Pennsylvania State University. Journal of Dairy Science.*, 93 :961–967.
- Fecteau, Gilles, Paul Baillargeon, Robert Higgins, Julie Paré, and Madeleine Fortin (2002). Bacterial contamination of colostrum fed to newborn calves in Québec dairy herds. *The Canadian Journal of Veterinary Research*, Volume 43. 524-527
- Fecteau, Gilles (2013). Prediction of serum IgG concentration by indirect techniques with adjustment for age and clinical and laboratory covariates in critically ill newborn calves. *The Canadian Journal of Veterinary Research*, 89, 77:89–94.
- Figuroa, D., Segura, J., García, L., Pescador, A., y Valdivia, A. (2012). Detection of antibodies and risk factors for infection with bovine respiratory syncytial virus and parainfluenza virus 3 in dual-purpose farms in Colima, Mexico. *Tropical Animal Health and Production*, 44(6), 1417-1421. doi: 10.1007/s11250-01200081-9.
- García, M., Cruz, C., Quezada, T., Silva, E., Valdivia, A., Vázquez, S., y Ramos, M. (2014). Prevalence and risk factors associated with infection by *Cryptosporidium* spp.in suckling calves in Aguascalientes, México. *Veterinaria-México. Veterinaria México OA*, 1(1), 1-12. <http://www.revistas.unam.mx/index.php/>
- García, M., Cruz, C., Quezada, T, Silva, E., Valdivia, A., Ramos, M. (2009). *Cryptosporidiosis* in dairy calves from Aguascalientes, Mexico: risk infection in

relation with season and month sampling. Journal of Animal and Veterinary Advances, 8(2), 1579-1583
<http://www.medwelljournals.com/new/5/archivedetails.php?id=5&jid>.

- Gelsinger, S.L., A. M. Smith, C. M. Jones y A. J. Heinrichs (2015). Technical note: Comparison of radial immunodiffusion and ELISA for quantification of bovine immunoglobulin G in colostrum and plasma. Journal of Dairy Science, ;98(6):4084-9. doi: 10.3168/jds.2014-8.
- Gelsinger, S.L, Jones, C.M, Heinrichs, A.J. (2015). Effect of colostrum heat treatment and bacterial population on immunoglobulin G absorption and health of neonatal calves. Journal of Dairy Science, 98(7), 4640-5. doi: 10.3168/jds.2014-8790
- Godden, S. M., S. McMartin, J. Feirtag, J. Stabel, R. Bey, S. Goyal, L. Metzger, J. Fetrow, S. Wells, y H. Chester (2006). Heat-Treatment of Bovine Colostrum. II: Effects of Heating Duration on Pathogen Viability and Immunoglobulin G. Journal of Dairy Science, 89:3476–3483.
- Godden. (2008). Colostrum Management for Dairy Calves. Veterinary Clinics Food Animal Practice 24, 19–39.
- Godden, S.M, Haines, D.M. y Hagman, D., (2009). Improving passive transfer of immunoglobulins in calves. I. Journal of Dairy Science, 92 :1750–1757. doi: 10.3168/jds.2008-1846.
- Godden, S. M., Haines, D. M. Konkol K y Peterson, J. (2009) Improving passive transfer of immunoglobulins in calves. II: Interaction between feeding method and volume of colostrum fed Journal of Dairy Science. 92 :1758–1764 doi: 10.3168/jds.2008-1847
- Godden., S. (2009). Microbial Hazards Associated with Feeding Colostrum Department of Veterinary Population Medicine University of Minnesota.
- Godden, S. M., Smolenski, D. J., Donahue, M., Oakes, JM., Bey, R., Wells, S., Fetrow, J. (2012). Heat-treated colostrum and reduced morbidity in preweaned dairy calves: Results of a randomized trial and examination of mechanisms of effectiveness Journal of Dairy Science. 95: 4029–4040.
- Godden, SM., Wells S., Donahue M., Stables J., Oakes JM., Sreevatnsan S., y Fetrow J. (2015). Effect of feeding heat-treated colostrum on risk for infection with *Mycobacterium avium* ssp. paratuberculosis, milk production, and longevity in Holstein dairy cows. Journal of Dairy Science., 98(8):5630-41. doi: 10.3168/jds.2015-9443.

- Grant, R. I., Williams, A. G., Michael, T., Rowe, y Donald, M. D. (2005). Efficacy of Various Pasteurization Time-Temperature Conditions in Combination with Homogenization on Inactivation of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in Milk. *Appl Environ Microbiol*, p. 2853–2861.
- Gulliksen, S. M. K. I. Lie, L. Sølverød, y O. Aster as, (2008.). Risk Factors Associated with Colostrum Quality in Norwegian Dairy Cows. *Jornal Dairy Science.*, 91:704–712.
- Herrera, López, E., F., Suárez, G., B. Arellano, R., y E.G. Palomares-Resendiz, R. H.-C. (2010). Experiences in Mexico of the vaccination in bovines and goats, with *Brucella abortus* RB51 strain. INIFAP. Current Research, Technology and Education Topics in Applied Microbiology and Microbial Biotechnology (Ed. Mendez-Vila A.) Vol. 2 ISBN (13): 978-84-614-6195-0. p. 694-699.
- Hompson, P. (1981). Colostral transfer of gamma glutamyl transpeptidase in calves. *New Zealand Veterinary Journal.*, 29: 223–226.
- Hurley, L., Walter, Theil, Peter, and, & K. (2011). Perspectives on Immunoglobulins in Colostrum and Milk. *Nutrients*, 3, 442-474; doi:10.3390/nu3040442.
- Kehoe, S., Jayarao, B., Heinrichs, & A. (2007). A survey of bovine colostrum composition and colostrum management practices on Pennsylvania dairy farms. *Journal of Dairy Science*, 90, 4108–4116.
- Kehoe, S. I, A. J. Heinrichs, PAS, M. L. Moody, C. M. Jones, y M. R. Long A. J, H., (2011). Comparison of immunoglobulin G concentrations in primiparous and multiparous bovine colostrum. *The Professional Animal Scientist*, Volume 27, Issue 3- 176-180.
- Kessler, C, E, R. M. Bruckmaier, y J. J. Gross Bruckmaier, (2014). Milk production during the colostrum period is not related to the later lactational performance in dairy cows. *Journal of Dairy Science*. 2014;97(4):2186-92. doi: 10.3168/jds.2013-7573. Epub 2014 Jan 31.
- Koldovsky, O. (1989). Search for role of milk-borne biologically active peptides for the suckling. *Journal Nutrition*, 119, 1543–1551.
- Larson, B., Heary, H., y Devery, J. (1980). Immunoglobulin Production and Transport by the Mammary Gland. *J. Journal of Dairy Science*, 63, 665-671.
- Lazzaro, J. (2002). Colostrum / Colostrum Supplementing/Supplements. Shenandoah Dairy Goat. www.saanedoah.com.
- Leblanc, S. (2010). Monitoring Metabolic Health of Dairy Cattle in Transition Period. *J Reproduction and Development* 2010 Jan;56 Suppl: S29-35.

- Liu, G.L., J.Q. Wang, D.P. Bu, J.B. Cheng, C.G. Zhang, H.Y. Wei, L.Y. Zhou, Z.F., H. Hu, X.L. Dong. (2009). Factors affecting the transfer of immunoglobulin G1 into the milk of Holstein cows. *The veterinary journal*, 5. 182(1): 79-8.
- Malmuthuge, Nilusha, Yanhong Chen, Guanxiang Liang, Laksiri A. Goonewardene, y Le Luo Guan (2015). Heat-treated colostrum feeding promotes beneficial bacteria colonization in the small intestine of neonatal calves. *Journal of Dairy Science.*, pi: S0022-0302(15)00622-0. doi: 10.3168/jd.
- McDonald, W. L., O'Riley, J. K., Schroen, J. C., y Condrón, R. J. (2005). Heat Inactivation of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in Milk. *Appl Environ Microbiol.* 2005 Apr; 71(4): 1785–1789. doi: 10.1128/AEM.71.4.1785-1789.2005 PMID: PMC1082562
- McGuirk. (2004). Managing production store and deliver colostrum. *Veterinary Clinics Food Animal Practice* 20, 593-603.
- McMartin, S., Godden, S., Metzger, L., Feirtag, J., Bey, R., Stabel, J., Chester-Jones, H. (2006). Heat Treatment of Bovine Colostrum. I: Effects of Temperature on Viscosity and Immunoglobulin G Level. *Journal of Dairy Science*, 89:2110–2118.
- Meale, S., Frederique, Chaucheyras-Durand., Berend., Harma, Luo, G. L., y Michael, Steele. (2017). From pre- to postweaning: Transformation of the young calf's gastrointestinal tract. *Journal of Dairy Science*, Jul;100 5984-5995. doi: 10.3168/jds.2016-12474. Epub 2017 May 17.
- Meléndez, R., Valdivia, A., Rangel, E., Díaz, E., Segura, J., & Guerrero, A. (2010). Abortion risk factors and reproductive performance of dairy cattle in Aguascalientes, México. *Revista Mexicana de Ciencias Pecuarias*, 1(4), 391-402. <http://www.tecnicapecuaria.org.mx/trabajos/201010150259.pdf>
- Menares-Arriagada, C. M. (2011). Efecto de uso de calostro comercial sobre la inmunidad pasiva en terneros Holstein nacidos en invierno. Valdivia Chile: Universidad Austral de Chile.
- Morin D. E., P. D. Constable, F. P. Maunsell, y G. C. McCoy (2001). Factors associated with colostrum specific gravity in dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 84(4): 937-943.
- Nickerson. (1989). Immunological Aspects of Mammary Involution. *Journal of Dairy Science*, 1989 Jun;72(6):1665-78.

- NMX-F-368-1983. (1983). Alimentos leche fluida fosfatasa residual método de prueba. México DF: Normas mexicanas dirección general de normas.
- Patel, S, Gibbons, J, Wathes, y D.C. (2014). Ensuring optimal colostrum transfer to newborn dairy calves. CATTLE PRACTICE VOLUME 22 PART 1 95 2014 Department of Production and Population Cattle Practice.
- Plaza, K., Martínez, y Ibalmea, Y. (2009.). Respuesta del uso eficiente del calostro en los terneros de una lechería. Revista Cubana de Ciencia Agrícola., Tomo 43, Número 1: 15-18.
- Quezada, T., García, V., Ortiz, R., Arredondo, J. L., Medina, L., Valdivia, A., & Montoya, A. (2014). Biochemical parameters in the blood of Holstein calves given immunoglobulin Y-supplemented colostrum. BMC Veterinary Research, 159(169), 1-7. doi:10.1186/1746-6148-10-159
- Ramos. (1976). C.M Manual de Métodos de Análisis de leche y laticinios. México DF: Ramos.
- Romo, Valdivia, A., Carranza, R., Cámara, J., Zavala, M., Flores, E., y Espinosa, J. (2014). Brechas de rentabilidad económica en pequeñas unidades de producción de leche en el altiplano central mexicano. Revista Mexicana de Ciencias Pecuarias, 5(4), 273-290. <http://www.tecnicapecuaria.org.mx/publicacion04.php?IdPublicacion=1301>
- Roth B. A, Keil, N. M, Gygax, L, y Hillmann E (2009) Influence of weaning method on health status and rumen development in dairy calves Journal of Dairy Science. 92:645–656 doi:10.3168/jds.2008-1153
- SAGARPA. (2015). Censo anual de Ganado 2015. Censo de Ganado. www.sagarpa.gob.mx/Transparencia/POT.../CuartoInformeDeLabores_SAGARPA.pdf
- Soheila, Zarei, G., Reza. Ghorbani, M., Khorvash, O., Martin, A., & Hossein. Mahdavi, A. R. (2017). The Impact of Season, Parity, and Volume of Colostrum on Holstein Dairy Cows Colostrum Composition. Agricultural Sciences, 8, 572-581.
- Staley, Theodore E., Lane D. Corley, Ixnvile J. Bush y E. Wy" Jones (1972.). The ultrastructure of neonatal calf intestine and absorption of heterologous proteins. Anatomical Record, 172: 559–579.
- Sung, Nackmoon y Michael T. Collins, (1998). Thermal Tolerance of Mycobacterium paratuberculosis. Applied and Environmental Microbiology, 999–1005.

- Teixeira, A., Bicalho, M., Machado, V., Oikonomou, G., Kacar, C., Foditsch, C., Bicalho, R. (2013). Heat and ultraviolet light treatment of colostrum and hospital milk: Effects on colostrum and hospital milk characteristics and calf health and growth parameters. *The Veterinary Journal*, 197 175–181.
- Vignoli, R. (1986). Esterilización Y Desinfección. *Temas de Bacteriología y Virología Médica* 33: 609-629
- Weaver et. al, D. T. (2000). Passive transfer of colostral immunoglobulins in calves. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 14: 569–577.
- Zurita, L. (1994). Calostro, Fuente de Vida del Recién Nacido. *Chile Agrícola*, 20, 286-288.



GLOSARIO

Absorción. Proceso por el cual los tóxicos cruzan las membranas celulares y entran en la circulación sanguínea o sistema linfático.

Ácido desoxirribonucleico (ADN). Molécula compleja, integrante de los cromosomas, que almacena la información hereditaria en forma de variaciones en la secuencia de las bases de purina y pirimidina; esta información se traduce en la síntesis de las proteínas, por lo que es determinante de todas las características físicas y funcionales de las células y del organismo.

Ácido ribonucleico (ARN). Ácido nucleico de cadena sencilla compuesto por los nucleótidos adenina, uracilo, guanina y citosina. En las células sirve como intermediario de la información genética ya que copia ésta del ADN y en el citoplasma dirige la síntesis de proteínas según su secuencia de nucleótidos.

Alanina aminotransferasa (ALT). Enzima involucrada en la transferencia de aminoácidos. Se utiliza para evaluar daño hepático, principalmente.

Albumina. Proteína que se encuentra en gran proporción en el plasma sanguíneo, siendo la principal proteína de la sangre; es sintetizada en el hígado.

Aspartato aminotransferasa (AST). Enzima presente normalmente en el suero y en ciertos tejidos corporales, que actúa sobre la transferencia intermolecular de un grupo amino desde el ácido aspártico al ácido alfa-cetoglutarico, para formar ácido glutámico y ácido oxaloacético.

Atrofia. Disminución importante del tamaño de la célula y del órgano del que forma parte, debido a la pérdida de masa celular. Las células atroficas muestran una disminución de la función, pero no están muertas.

Bilirrubina. Pigmento amarillento que se encuentra en la bilis, un líquido producido por el hígado.

Biotransformación. Cualquier transformación química de una sustancia producida por organismos vivos o por preparaciones obtenidas de éstos. Conversión de un químico desde una forma a otra por un organismo biológico.

Calostro. Primera secreción láctea después del parto que contiene inmunoglobulinas, hormonas, factores de liberación y nutrientes.

Cepa. Conjunto de microorganismos derivados de las múltiples divisiones de una célula inicial.

Código. Conjunto de signos conocidos por quienes establecen una comunicación.

Cromatografía líquida de alta presión (HPLC). Técnica utilizada para separar los componentes de una mezcla basándose en diferentes tipos de interacciones químicas entre las sustancias analizadas y la columna cromatográfica.

Decodificación. Traducción de palabras impresas a palabras habladas.

Distribución es el proceso durante el cual una sustancia química absorbida es transferida desde su sitio de absorción a otras áreas del cuerpo.

ELISA (enzyme-linked immunosorbant assay). Es un ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas para la cuantificación de la presencia de un antígeno usando una enzima enlazada a un anticuerpo para el antígeno.

Esquemas. Estructura representativa de los conceptos genéricos almacenados en la memoria individual. Son las estructuras básicas para organizar la información; conceptos. Unidad estructural básica donde se fundamenta todo el conocimiento.

Estrategia. Planeación general de actividades orientadas a un fin.

Fosfatasa alcalina (FA). Enzima hidrolasa responsable de catalizar la remoción de un grupo fosforil de varios tipos de moléculas como nucleótidos, proteínas y alcaloides. Los tejidos con cantidades más altas de FA abarcan el hígado, las vías biliares y los huesos.

Gamma-glutamyltranspeptidasa (GGT). Enzima que cataliza la transferencia de una porción de gamma-glutamyl de glutatión a un aceptor que puede ser un aminoácido, un péptido o una molécula de agua. Juega un papel importante en el ciclo de la gamma-glutamyl, una vía para la síntesis y degradación de glutatión y desintoxicación de drogas y xenobióticos.

Genotipo. Conjunto de genes característicos de cada especie, vegetal o animal, es decir, son los genes en formato de ADN que un animal o vegetal recibe de herencia de parte de sus dos progenitores y que por tanto se encuentra conformado por las dos dotaciones de cromosomas que contienen la información genética del ser en cuestión.

Genotoxicidad. Capacidad para causar daño al material genético; el daño puede ser tipo mutágeno o carcinógeno.

Glutatión reducido (GSH). Tripéptido no proteínico; es un antioxidante cuya función es la de mantener la estabilidad de la membrana, reducir los factores de estrés oxidativo y las especies de oxígeno reactivas que se producen a partir del proceso de peroxidación de lípidos.

Habilidades cognitivas. Sistemas de acciones necesarias para resolver una tarea determinada.

Habilidades metacognitivas. Capacidad de las personas de adaptarse, consciente o inconscientemente, a las exigencias de la tarea y de responder a ellas adecuadamente, es decir, la capacidad autorregulatoria que responde a la intervención ambiental externa.

Hepatotóxico. Sustancia nociva para las células del hígado.

Híbrido. Animal o vegetal que procede de la unión de dos individuos de especies diferentes.

Hiperplasia. Incremento del número de células de un órgano o tejido.

Índice de conversión alimenticia. Kilos de alimento necesario para reponer un kilo de peso vivo.

Inmunosupresor. Sustancia química que produce la supresión del sistema inmunitario.

Inmunoglobulina. Anticuerpo específico para defensa inmunológica de los seres vivos.

Intoxicación. Proceso patológico, con signos y síntomas clínicos, causado por una sustancia de origen exógeno o endógeno.

Isoenzimas (isoformas). Enzimas en un organismo que catalizan la misma reacción, pero difieren en estructura; estas diferencias pueden tener un rango de uno a varios residuos de aminoácidos.

Metabolismo. Suma de todos los procesos químicos y físicos que tienen lugar en un organismo; en sentido más estricto, cambios físicos y químicos que sufre una sustancia en un organismo. Incluye la incorporación y distribución en el organismo de los componentes químicos, los cambios (biotransformaciones sufridas) y la eliminación de los compuestos y de sus metabolitos.

Metabolito. Cualquier producto intermedio o final resultante del metabolismo. Término relacionado. Biotransformación.

Micotoxina. Metabolito secundario tóxico, de composición variada, producidos por organismos del reino fungi; suele referirse a sustancias tóxicas producidas por hongos que afectan a animales vertebrados en bajas concentraciones.

Mutagénico. Cualquier sustancia que puede inducir cambios heredables (mutaciones) en el genotipo de una célula como consecuencia de alteraciones o de pérdida de genes o de cromosomas o de parte de los mismos. Perturba a la secuencia de bases del ADN y causa una mutación; con frecuencia son químicos, pero pueden también ser fuentes de energía tales como la luz ultravioleta.

Neurotóxico. Sustancia nociva para las células de los riñones.

PCR. Prueba de reacción en cadena de la polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés: Polymerase Chain Reaction), que es una técnica de biología molecular desarrollada en 1986 por Kary Mullis.

Proteína. Una macromolécula biológica compuesta de un arreglo lineal de aminoácidos unidos por uniones peptídicas; las funciones de las proteínas en los procesos biológicos incluyen catálisis, transporte y almacenaje, movimiento, soporte mecánico, protección inmune, la generación y transmisión de impulsos nerviosos y el control del crecimiento y diferenciación.

Significado. Representación mental de una realidad o una idea, concepto.

Significante. Medio para expresar un significado, señal.

Signo. Representación arbitraria de las palabras. Relación de un significado y un significante.

Susceptibilidad. Condición en la que existe una disminución de la resistencia de un individuo frente a determinada enfermedad o intoxicación, y que se experimenta con dosis a exposiciones inferiores a las habitualmente nocivas para el resto de la población.

Teratogénico. Agente que por administración a la madre en periodo prenatal induce malformaciones estructurales o defectos en la descendencia.

Toxicidad. Capacidad para producir daño a un organismo vivo, en relación con la cantidad o dosis de sustancia administrada o absorbida, la vía de administración y su distribución en el tiempo (dosis única o repetidas), tipo y severidad del daño, tiempo necesario para producir éste, la naturaleza del organismo afectado y otras condiciones intervinientes.

Transferencia de inmunidad pasiva. Trasmisión de anticuerpos por absorción intestinal en los becerros neonatos.

Tratamiento térmico. Tratamiento con calor para calostro 60 grados centígrados por 60 minutos.

ANEXOS

INDICE DE ANEXOS

ANEXOS	85
Anexo A PROPUESTA DE ARTICULO PARA PUBLICAR	86
Anexo B DESCRIPCIÓN DE TÉCNICAS.....	99
Anexo B.1. Fosfatasa alcalina	99
Anexo B.2 Inmunodifusión Radial.....	105
Anexo B.3 Pruebas Bacteriológicas	108
Anexo C CONGRESOS Y PUBLICACIONES.....	122

Anexo A PROPUESTA DE ARTICULO PARA PUBLICAR

RESUMEN

Ponce Hernández J. E, Valdivia Flores A. G, Gutiérrez Chávez A. J, Padilla Ramírez F. J, Campos M, Haubi C.U. y Luna E.

El objetivo de este trabajo fue hacer un sondeo de riesgo de contaminación por patógenos durante 3 diferentes etapas del manejo de calostro en condiciones de campo. Para este estudio de sondeo se seleccionaron por el método no probabilístico de conveniencia dos explotaciones lecheras tecnificadas con hatos grandes (>1000 vacas), ubicadas en el Altiplano Central Mexicano, que practicaban el tratamiento térmico (TT) de calostro de forma rutinaria con equipo similares. Durante un periodo de seis meses se obtuvieron aleatoriamente 336 muestras de calostro A) fresco, B) con tratamiento térmico y C) en el momento de ser suministrado con biberón. Se congelaron las muestras en viales de plástico (50 mL) identificados y se determinó contaminación bacteriana por medio de prueba de turbidez en el medio de cultivo caldo tripticasa soya de las muestras de calostro. Los resultados de esta prueba indican que el riesgo de contaminación de calostro es muy alto independientemente de la etapa de colección: 95% de las muestras de calostro fresco fueron positivas a la prueba de turbidez. También un gran porcentaje, 90% de muestras obtenidas después del tratamiento térmico y al momento de ser suministrado a la becerro resultaron positivas a la prueba de turbidez. Todas las muestras con indicación de crecimiento bacteriano en este cultivo se les dio seguimiento con cultivos sólidos y tinción Gram para la subsecuente identificación de *Brucella*. Resultados de estas pruebas subsecuentes indican que 59 de las 336 muestras obtenidas estaban contaminadas con *Brucella*. 20 de estas muestras provenían del grupo de muestras A, 19 del grupo B y 20 del grupo C. La identidad de 10 muestras aleatorias de este grupo de muestras positivas a *Brucella* fue confirmada molecularmente por PCR. Los resultados obtenidos en este estudio de sondeo indican que el riesgo de contaminación microbiana presente en las muestras del calostro no disminuyó significativamente entre el calostro fresco, tratado térmicamente y hasta el momento de ser suministrado con biberón. Estos resultados sugieren que en condiciones de campo la implementación de prácticas de manejo de tratamiento térmico de calostro bovino para reducir el riesgo de transmisión de *Brucella* de adultos a becerros de remplazo es insuficiente para reducir el riesgo de contaminación en las diferentes etapas de proceso.

Palabras clave: Calostro, Contaminación Bacteriana, tratamiento térmico,

Introducción

La importancia de alimentación temprana de becerros recién nacidos con calostro de alta calidad ha sido ampliamente documentada. Los atributos de calostro más reconocidos incluyen una fuente

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

inmediata de la energía para termorregulación y la transferencia de anticuerpos maternos para la protección contra enfermedades infecciosas durante las primeras semanas de vida. El calostro también puede ser una fuente importante de transmisión de agentes infecciosos que persisten en los hatos lecheros y podría ser parcialmente responsable de mantener estable la prevalencia de infecciones en el hato. La presencia de patógenos en el calostro puede ocurrir por transmisión directa dentro de la glándula mamaria de una vaca infectada o por contaminación del calostro con heces, orina u otras secreciones después del ordeño de la vaca. Por lo tanto, el calostro puede potencialmente estar contaminado con cualquier patógeno presente en la lechería. Las buenas prácticas de higiene y saneamiento durante la recolección de calostro reducirán el riesgo de transmisión debido a la contaminación con algunos agentes infecciosos, pero no tiene efecto sobre el riesgo de transmisión de agentes patógenos secretadas dentro de la glándula mamaria incluyendo agentes infecciosos que causan enfermedades que activamente se están intentado erradicar como es el caso de la brucelosis en México.

Varios protocolos de bioseguridad para disminuir el riesgo de transmisión de *Brucella abortus* de adultos infectados a las becerras de remplazo se han implementado en México, uno que se ha popularizado en establos tecnificados incluye el tratamiento térmico (TT) del calostro utilizando un método a baja temperatura y tiempo más largo (60°C durante 60 minutos). Se ha demostrado que este tipo TT al calostro mantiene la bioactividad de las IgG y las características del fluido del calostro, eliminando o reduciendo significativamente los patógenos importantes incluyendo *E. coli*, *Salmonella spp*, *Mycoplasma bovis* y *Mycobacterium avium Paratuberculosis* (MAP). Es importante destacar que este protocolo TT reduce los conteos bacterianos, pero no esteriliza. Si el calostro está muy contaminado, estos parámetros no eliminarán todos los patógenos. Además, el equipo debe mantenerse cuidadosamente y calibrarse rutinariamente para asegurar la calidad del proceso de TT. No hay una prueba para evaluar la carga microbiana antes o después del TT en la finca, por lo que la eficacia de este protocolo de bioseguridad sigue siendo incierta. Muchos establos lecheros han invertido en equipos comercializados para su uso en campo y han establecido protocolos para efectuar TT de calostro; sin embargo, en algunos establos existe la percepción que la implementación de esta práctica de manejo no ha tenido impacto en disminuir la prevalencia de brucelosis en el hato. Por esta observación existe la duda de si el manejo intensivo de calostro necesario para efectuar el TT provee oportunidades de contaminación cruzada reduciendo así la eficacia en campo de una práctica de manejo que de hecho se implementó para reducir dicho riesgo. El objetivo de este estudio fue evaluar contaminación a diferentes etapas de procesamiento de calostro.

Materiales y Métodos

El estudio se desarrolló en el Altiplano Central Mexicano, en la Mesa Central, valle de Zacatecas/ Aguascalientes donde se seleccionaron dos establos tecnificados por el método no estadístico de conveniencia, pero de tamaño y funcionamiento comparable (Tabla 1). Ambos ranchos usan ordeño mecánico automatizado, con carrusel de 40 unidades marca Westfalia contaban con equipo para TT (pasteurizador) de calostro el cual usan cotidianamente. Ambos equipos para TT tienen capacidad 40 L y el manejo de vaca seca, parto, parto y post parto es similar en los dos ranchos. Las vacas se secan a los 7 meses de gestación, y permanecen en el corral de secas hasta 21 días antes del parto. Al momento del parto son separadas a un corral dedicado a partos para su evaluación y atención de parto.

Muestras de calostro:

El calostro se colecta cuando las vacas se van a ordeñar en el turno que les corresponde después del parto siguiendo la misma rutina de ordeño general del establo incluyendo desinfección, limpieza de la teta, secado despunte y colocación de pezoneras. El calostro se desvió a jarras de piso que se usan como contenedor de traslado al área donde se encuentra el equipo para el TT.

El calostro colectado se clasificó en 2 categorías usando un calostrómetro; lectura de más de 80 en densidad como categoría 1 y menos de 80 como categoría 2. El calostro ya clasificado se sometió a TT, dos lotes por día donde junta el calostro de todas las vacas paridas en ese turno usando el protocolo indicado por el fabricante que corresponde a un tratamiento de 60 °C por 60 minutos, y se enfría a 37 °C. Después del TT el calostro se evaluó con el calostrómetro una vez más para verificar la densidad y etiquetar como categoría correspondiente. Después de la verificación el calostro se envasó en biberones de 2.0 L de capacidad y se congeló a - 18 °C para su conservación. Antes de ser usado los biberones con calostro congelado se descongelaron en baño maría a 45°C.

Para este estudio se colectaron un total de 336 muestras de calostro a diferentes etapas del proceso y todas las muestras se colectaron en viales estériles de 50 ml que se almacenaron en congelamiento hasta el momento de ser procesados. Las 112 muestras de la primera etapa del proceso (muestras A) se colectaron directamente de las jarras de piso. Las muestras de la segunda etapa (muestras B) se colectaron del biberón antes de ser congelados, y las muestras de la última etapa (muestras C) también se colectaron de los biberones al momento de la alimentación de las becerras.

Tabla 1 Comparación de parámetros productivos por rancho durante el estudio (feb-ago. 2016).

	RANCHO 1	RANCHO 2
Vacas Producción	2369	1005
Vacas Secas	378	138
Becerras y Vaquillas	1759	912
Machos	122	435
Producción vaca/lactancia 305 días	9,134	9,533
Relación forraje/concentrado	45/55	55/45
Días en Leche	166	154
Período Seco	73	65
Intervalo entre partos	14.5	14.2
Dosis de concepción	3.8	2.5
Tasa de Preñez %	21	25
Trampas en comedero	+	+
Tejaban en comedero y echadero	+	+
Echaderos con cama común	+	+

Bacteriología

Para determinar si las muestras de calostro estaban contaminadas se usó prueba de turbidez en caldo agar tripticasa. A todas las muestras de calostro se les extrajo suficiente material congelado para llenar un vial de 1.0 mL usando método de raspado y perforación con equipo de acero inoxidable en cámara de presión positiva. El contenido del vial se dejó descongelar y se usó como inóculo de los tubos de ensayo con medio caldo agar tripticasa en presencia de mechero. Después de 24 horas de incubación todas las muestras turbias a inspección visual cualitativa como indicador de crecimiento bacteriano en este medio de cultivo se les dio seguimiento con cultivos sólidos. La siembra en cultivos sólidos se efectuó por inoculación del caldo con asa en presencia de mechero en cámara de presión positiva. Los cultivos sólidos empleados en este estudio incluyen agar tripticasa, agar sangre, y agar Brucella. Colonias aisladas en cada medio de cultivo se usaron para conducir tinción Gram, morfología por microscopio y pruebas bioquímicas de oxidasa y peroxidasa para identificación subsecuente de las bacterias aisladas usando estos medios de cultivo.

Las muestras positivas a turbidimetría, identificación microscópica de colonias por crecimiento en agar tripticasa *Brucella*, positivas a color rosado en tinción de Gram, y positivas a peroxidasa, fueron determinadas positivas a *Brucella sp.* Diez cultivos representativos de las muestras positivas por estos métodos bacteriológicos para identificar *Brucella sp* se enviaron a el laboratorio del Comité de Sanidad Animal de la Laguna para la confirmación de su identificación usando la prueba genética PCR para *Brucella sp.*

Las 10 muestras representativas resultaron positivas al protocolo de PCR diseñado para confirmar aislamiento de bacteriano correspondía a *Brucella sp.*

Resultados

La presencia de microorganismos en las muestras de calostro colectadas a diferentes etapas del proceso de manejo de calostro se determinó por medio turbidimetría usando la prueba de caldo tripticasa. Resultados de esta prueba indicaron que de un total de 336 muestras colectadas entre los dos ranchos 305 (90.8%) estaban contaminadas con algún tipo de bacteria capaz de multiplicarse en este medio de cultivo. Como se puede observar en la Tabla 2 el número de muestras positivas después del TT disminuyo un poco en Rancho 1 pero no sucedió en Rancho 2 indicando que el TT tiene un efecto limitado en eliminar la carga bacteriana en muestras de calostro y no hay diferencias significativas por rancho o por etapa de colección.

Las 305 muestras con indicación de crecimiento bacteriano en caldo tripticasa se sembraron en cultivos sólidos y subsecuentemente se le sometió a tinción Gram, morfología por microscopio y pruebas bioquímicas de oxidasa y peroxidasa para discernir la presencia de bacterias patógenas en las muestras de calostro. Resultados de estas pruebas demuestran que cierto porcentaje de las muestras contenían bacterias potencialmente patógenas (Tabla 3). Organismos identificados como *Brucella sp* usando estas técnicas bacteriológicas fueron aisladas en 20 de 112 muestras de calostro recolectadas en las jarras de piso (A), en 19 de 112 muestras colectadas después del tratamiento térmico (B) y en 20 de 112 muestras de calostro colectadas al momento de alimentación de las becerras (C) lo que sugiere que en condiciones de campo el TT es insuficiente para eliminar bacterias de la especie la *Brucella sp.* en calostro o alternativamente el calostro puede ser contaminado con *Brucella sp.* en etapas subsecuentes al TT de calostro. En contraste, Enterobacterias se aislaron en solo 2 de 112 muestras de calostro recolectadas en las jarras de piso (A), pero no se aislaron en ninguna de las muestras colectadas después del tratamiento térmico (B) lo que sugiere que el TT fue capaz de eliminar este tipo de bacteria.

Desafortunadamente 3 de 112 muestras de calostro colectadas al momento de alimentación de las becerras resultaron una vez más positivas a Enterobacterias (C) lo que sugiere que procedimientos posteriores al TT proveen oportunidades de re-contaminación del calostro. Levaduras y Estreptococos se aislaron en algunas de las muestras durante las 3 etapas de colección de

muestras usadas en este estudio (A, B, y C) lo que sugiere que en condiciones de campo el TT es insuficiente para eliminar este tipo de organismos o alternativamente el calostro puede ser contaminado con organismos presentes en el medio ambiente o fómites en cualquier etapa del manejo de calostro.

Tabla 2 Muestras positivas a crecimiento bacteriano por cultivo Caldo Tripticasa con presencia activa de microorganismos en calostro fresco, después de tratamiento térmico y suministrado con biberón.

Tipo de muestra	Numero de muestras	Caldo Tripticasa Positivas	Porcentaje de positivas
Rancho 1	231	209	90.5%
A	77	74	96.1 %
B	77	67	87.0%
C	77	68	88.3%
Rancho 2	105	96	91.4%
A	35	32	91.4%
B	35	32	91.4%
C	35	32	91.4%
TOTAL	336	305	90.8%

A= Fresco, B= Después de TT, C= Biberón

Tabla 3 Cambio en la prevalencia (P) de microorganismos patógenos detectada en muestras de calostro fresco (A), tratado térmicamente (B) y al ser suministrado con biberón (C).

Microorganismos patógenos	A			B			Cambio	C			Cambio
	(-)	(+)	P (%)	(-)	(+)	P	(%)	(-)	(+)	P	(%)
Levaduras	107	5*	4.5	99	13*	11.6	160	104	8*	7.1	60.0
Estreptococos	73	39*	34.8	79	33*	29.5	-15.4	82	30*	26.8	-23.1
Enterobacterias	110	2*	1.8	112	0*	0.0	-100	109	3*	2.7	50.0
Brucella	92	20*	17.9	93	19*	17.0	-5.0	92	20*	17.9	0.0

(-) Muestra sin crecimiento microbiano; (+) Muestra con crecimiento microbiano; P Prevalencia: +/total *100. Cambio: P en calostro tratado / P calostro fresco * 100; números positivos indican contaminación en el proceso.

*Número de muestras positivas a Levaduras, Enterobacterias, Estreptococos y BR (Brucella) muestra con qué frecuencia se presentan los 2 valores de agentes con cada uno de los 3 valores de TRATAMIENTO. Las clasificaciones de fila y columna son independientes con un nivel de confianza del 95.0%. Por lo tanto, el valor observado de bacterias para un caso en particular pudiera no tener relación con su valor en TRATAMIENTO (Chi-Cuadrada P<0.05).

Una observación de interés es la diferencia entre Ranchos en la tendencia del número (porcentaje) de muestras positivas a *Brucella* sp. En el Rancho 1 se observó una tendencia de disminución de muestras positivas a *Brucella* sp después del TT y en el Rancho 2 se observó lo contrario (Tabla 4). En Rancho 1 el 22.1 % de muestras de calostro fresco fueron positivas a *Brucella* sp, y ese porcentaje es menor después del TT a 15.6% y 14.3% en muestras de calostro de etapa B, y C respectivamente.

El porcentaje de muestras de calostro positivas a *Brucella sp* en el Rancho 2 fue menor (8.6%) que en el Rancho 1 (22.1%) sin embargo ese porcentaje aumento después del TT. El 20.0 % de muestras de calostro colectadas en la etapa B y el 25.8% de las muestras colectadas en la etapa calostro resultaron positivas a *Brucella sp*. Estos resultados pueden indicar que en condiciones de campo existen riesgos de contaminación con *Brucella sp* después del tratamiento térmico (Tabla 4).

Diez muestras representativas de cultivos positivos a *Brucella sp* por medio de cultivo se usaron para confirmar la identidad del aislamiento usando PCR específico para identificar *B. abortus*. Los 10 aislamientos enviados a confirmación resultaron positivos en PCR lo que ayuda a ratificar los resultados de aislamiento por cultivo de *Brucella sp* que se presentan en este estudio.

Tabla 4. Comparación entre Ranchos en el número (porcentaje) de muestras positivas a *Brucella* a las diferentes etapas de colección de muestras.

Origen de la muestra	Numero de muestras	Rancho 1 + (%)	Numero de muestras	Rancho 2 + (%)
CF	77	17 (22.1)	35	3 (8.6)
CTT	77	12 (15.6)	35	7 (20.0)
CS	77	11 (14.3)	35	9 (25.8)
TOTAL	231	40 (17.3)	105	19 (18.1)

CF= Calostro Fresco, CTT= Calostro después de TT, CS=Calostro al suministro con Biberón

Discusión

Incentivos para que establos mexicanos sean libres de brucelosis han intensificado las iniciativas que las lecherías están implementando para reducir la prevalencia y eventualmente erradicar la enfermedad en el ható. Ha sido bien documentado que contaminación de calostro con *B. abortus* puede ser una fuente importante de transmisión a becerras recién nacidas por lo cual muchos establos lecheros han establecido protocolos para efectuar TT que ayuden mitigar este riesgo. Desafortunadamente no existen pruebas de campo para certificar la inocuidad del calostro después del TT y en algunos establos existe la percepción que la implementación de esta práctica de manejo no ha tenido impacto en disminuir la prevalencia de brucelosis en el ható. En este estudio hicimos un sondeo de riesgo de contaminación por patógenos durante 3 diferentes etapas del manejo de calostro en condiciones de campo en 2 ranchos y nuestros resultados indican que en condiciones de campo la implementación de prácticas de manejo de tratamiento térmico de calostro bovino es insuficiente para reducir el riesgo de transmisión de *Brucella sp* de adultos a becerras de remplazo. En este estudio de sondeo encontramos que tanto el calostro fresco, así como el calostro después del TT puede estar contaminado con *Brucella sp*, y esta observación puede explicar la observación en campo de que la prevalencia de brucelosis en ranchos no disminuye significativamente al transcurso de los años, a pesar de la implementación de prácticas de TT.

Independientemente, de que el TT en condiciones de campo no parece ser efectivo en eliminar *Brucella sp*, existen muchos riesgos de contaminación en el proceso de colección, tratamiento, almacenamiento y suministro de calostro a las becerras. En granjas comerciales en Estados Unidos, y bajo condiciones controladas en el proceso de TT reduce la concentración de microorganismos patógenos y conserve la cantidad de Igs. (Donahue, et al., 2012). Experimentalmente se demostró que el protocolo de TT de 60 °C por 60min es seguro para eliminar la mayoría de la microorganismos patógenos presentes en el calostro como lo demuestra (Godden, et al., 2006), aunque se observa en los resultados que no siempre es seguro para eliminar *Mycobacterium avium*, aun en condiciones de laboratorio, y en condiciones de campo se demostró, después de 7 años de seguimiento a las becerras alimentadas con calostro tratado y crudo, que dicho protocolo no mitigo hubo significativamente en la prevalencia de paratuberculosis en estos animales (Godden, et al., 2015). El hecho de que el número de muestras contaminada con *Brucella sp* aumento después del TT en Rancho 2 sugiere que en condiciones de campo pueden existir oportunidades de contaminación posteriores al TT, por ejemplo, variación en la calidad de limpieza de equipo, usado durante el proceso de transporte, clasificación y envase del calostro indicando que medidas de higiene y bioseguridad tienen que ser implementadas para evitar contaminaciones secundarias.

En conclusión, este estudio de sondeo claramente indica que en condiciones de campo existe un riesgo de que el TT implementado para reducir el riesgo de transmisión de brucelosis en el hato no está cumpliendo el objetivo deseado y que el manejo adicional necesario para implementar esta práctica de bioseguridad (clasificación, envasado, descongelación) pueden aumentar el riesgo de contaminación y trasmisión vertical a la becerro.

BIBLIOGRAFÍA

Barrington, M, G, Gay, J, M. (2002). Biosecurity for neonatal gastrointestinal diseases. *Veterinary Clinique Food Animal*, 18, 7–34.

Baumrucke, C. R., Rahel S Zbinden, H. A., Rummelink, G. J., Kemp, B., Knegsel, A. (2014). Continuous milking of dairy cows disrupts timing of peak IgG concentration appearance in mammary secretions. *Journal of Dairy Research*, 81 403–409.

Besser TE, Gay CC, Pritchett L. (1991). Comparison of three methods of feeding colostrum to dairy calves. *Journal of the American Veterinary Medical Association*. 198: 419–422.

Besser TE, Gay CC, (1985.). Septicemic Colibacillosis and Failure of Passive Transfer of Colostral Immunoglobulin in Calves. *Veterinary Clinics: Food Animal Practice*. 1: 445-459.

Campos, M, y Godson, D. (2003). The effectiveness and limitations of immune memory: understanding protective immune responses. *International Journal for Parasitology* 33, 655–661.

Carrisoza, M. D. (2104). Transmisión de *Brucella abortus* en becerras menores de tres meses diagnosticadas por medio de las pruebas de tarjeta e inmunodifusión radial en dos hatos lecheros del estado de Querétaro. Número especial *Veterinaria México.*, 2014 11.

D. Cavestany, J. E. Blanc, M. Kulcsar, G. Uriarte, P. Chilbroste, A. Meikle, H. Febel, A. Ferraris and E. Krall. (2005). Studies of the Transition Cow Under a Pasture-based Milk Production System. *Journal Veterinary Medicine*, A 52, 1–7.

Cisneros, L. F., Valdivia, A., Waldrup, K., Díaz, E., Martínez, A., Cruz, C., & Ortiz, R. (2012). Surveillance for mycobacterium bovis transmission from domestic cattle to wild ruminants in a Mexican wildlife-livestock interface area. *American Journal of Veterinary Research*, 73 (10), 1617-1625. doi:10.2460/ajvr.73.10.1617

Corbelini, C. N. (1997). Influencia de la nutrición en las enfermedades de la producción de las vacas lecheras en transición. 1st International Conference on Emerging Zoonoses Jerusalem, Israel. Vol. 3, No. 2, April–June 1997

Davis, C., y Dreckley, J. (1998). The development, nutrition, and management of the young calf. Iowa State University Press. 188-189.

Deelen, S., Ollivet, T. L., Haines, D. M., & Leslie, a. K. (2014). Evaluation of a Brix refractometer to estimate serum immunoglobulin G concentration in neonatal dairy calves. *Journal of Dairy Science*, 97 :3838–3844.

Díaz, E. A. (2013). Epidemiología de la brucelosis causada por *Brucella melitensis*, *Brucella suis* y *Brucella abortus* en animales domésticos. *Rev. Scientific and technical review of the office international des epizooties*, 32 (1), 43-51.

Donahue M., Godden, S. M., Bey, R., Wells, S., Oakes, J. M., Sreevatsan, S., Fetrow, J. (2012). Heat treatment of colostrum on commercial dairy farms. *Journal of Dairy Science*, 95, 2697–2702.

Donovan, G. A., I, Badinga R. J. Collier, C. J. Wilcox, and r. K. Braun (1986 ;). Factors influencing passive transfer in dairy calves. *Journal of Dairy Science*, 69:754-9.

Elizondo-Salazar, J. A, y Heinrichs, A. J., (2008). Review: Heat Treating Bovine. *The Professional Animal Scientist* 24, 530–538.

Elizondo- Salazar, J. A., Jayarao, M., B., y Heinrichs, A, J. (2010). Effect of heat treatment of bovine colostrum on bacterial counts, viscosity, and immunoglobulin G Concentration. *The Pennsylvania State University. Journal of Dairy Science.*, 93 :961–967.

Fecteau, G. P. (2002). Bacterial contamination of colostrum fed to newborn calves in Québec dairy herds. *The Canadian Journal of Veterinary Research*, Volume 43.

Fecteau, Gilles J. A. (2013). Prediction of serum IgG concentration by indirect techniques with adjustment for age and clinical and laboratory covariates in critically ill newborn calves. *The Canadian Journal of Veterinary Research* 89, 77:89–94.

Figuroa, D., Segura, J., García, L., Pescador, A., y Valdivia, A. (2012). Detection of antibodies and risk factors for infection with bovine respiratory syncytial virus and parainfluenza virus 3 in dual-purpose farms in Colima, Mexico. *Tropical Animal Health and Production*, 44(6), 1417-1421. doi: 10.1007/s11250-01200081-9.

García, M., Cruz, C., Quezada, T., Silva, E., Valdivia, A., Vázquez, S., y Ramos, M. (2014). Prevalence and risk factors associated with infection by *Cryptosporidium* spp.in suckling calves in Aguascalientes, Mexico. *Veterinaria-México. Veterinaria México OA*, 1(1), 1-12.
<http://www.revistas.unam.mx/index.php/>

García, M., Cruz, C., Quezada, T, Silva, E., Valdivia, A., Ramos, M. (2009). Cryptosporidiosis in dairy calves from Aguascalientes, Mexico: risk infection in relation with season and month sampling. *Journal of Animal and Veterinary Advances*, 8(2), 1579-1583
<http://www.medwelljournals.com/new/5/archivedetails.php?id=5&jid>.

Gelsing, S.L., A. M. Smith, C. M. Jones y A. J. Heinrichs (2015). Technical note: Comparison of radial immunodiffusion and ELISA for quantification of bovine immunoglobulin G in colostrum and plasma. *Journal of Dairy Science*, ;98(6):4084-9. doi: 10.3168/jds.2014-8.

Gelsing, S.L, Jones, C.M, Heinrichs, A.J. (2015). Effect of colostrum heat treatment and bacterial population on immunoglobulin G absorption and health of neonatal calves. *Journal of Dairy Science*, 98(7), 4640-5. doi: 10.3168/jds.2014-8790

Godden, S. M., S. McMartin, J. Feirtag, J. Stabel, R. Bey, S. Goyal, L. Metzger, J. Fetrow, S. Wells, y H. Chester (2006). Heat-Treatment of Bovine Colostrum. II: Effects of Heating Duration on Pathogen Viability and Immunoglobulin G. *Journal of Dairy Science*, 89:3476–3483.

Godden. (2008). Colostrum Management for Dairy Calves. *Veterinary Clinics Food Animal Practice* 24, 19–39.

Godden, S.M, Haines, D.M. y Hagman, D., (2009). Improving passive transfer of immunoglobulins in calves. I. Journal of Dairy Science, 92 :1750–1757. doi: 10.3168/jds.2008-1846.

Godden, S. M., Haines, D. M. Konkol K y Peterson, J. (2009) Improving passive transfer of immunoglobulins in calves. II: Interaction between feeding method and volume of colostrum fed Journal of Dairy Science. 92 :1758–1764 doi: 10.3168/jds.2008-1847

Godden., S. (2009). Microbial Hazards Associated with Feeding Colostrum. Department of Veterinary Population Medicine University of Minnesota.

Godden, S. M., Smolenski, D. J., Donahue, M., Oakes, J., Bey, R., Wells, S., Fetrow, J. (2012). Heat-treated colostrum and reduced morbidity in preweaned dairy calves: Results of a randomized trial and examination of mechanisms of effectiveness Journal of Dairy Science. 95, 4029–4040.

Godden, Wells, Donahue, Stables, Oakes, Sreevansan, y Fetrow. (2015). Effect of feeding heat-treated colostrum on risk for infection with Mycobacterium avium ssp. paratuberculosis, milk production, and longevity in Holstein dairy cows. Journal of Dairy Science., 98(8):5630-41. doi: 10.3168/jds.2015-9443.

Grant, R, I., Williams, A. G., Michael, T., Rowe, y Donald, M. D. (2005). Efficacy of Various Pasteurization Time-Temperature Conditions in Combination with Homogenization on Inactivation of Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis in Milk. Applied and environmental microbiology, p. 2853–2861.

Gulliksen, S. M. K. I. Lie, L. Sølverød, y O. Aster as, (2008.). Risk Factors Associated with Colostrum Quality in Norwegian Dairy Cows. Jornal Dairy Sáciense., 91:704–712.

Herrera, López, E., F., Suárez, G., B. Arellano, R., y E.G. Palomares-Resendiz, R. H.-C. (2010). Experiences in Mexico of the vaccination in bovines and goats, with Brucella abortus RB51 strain. INIFAP.

Hompson, P. (1981). Colostral transfer of gamma glutamyl transpeptidase in calves. New Zealand Veterinary Journal., 29: 223–226.

Hurley, L., Walter, Theil, Peter, and, & K. (2011). Perspectives on Immunoglobulins in Colostrum and Milk. Nutrients, 3, 442-474; doi:10.3390/nu3040442.

Kehoe, S., Jayarao, B., Heinrichs, & A. (2007). A survey of bovine colostrum composition and colostrum management practices on Pennsylvania dairy farms. Journal of Dairy Science, 90, 4108–4116.

Kehoe, S. I, A. J. Heinrichs, PAS, M. L. Moody, C. M. Jones, y M. R. Long A. J, H., (2011). Comparison of immunoglobulin G concentrations in primiparous and multiparous bovine colostrum. The Professional Animal Scientist, Volume 27, Issue 3, Pages 176-180.

Kessler, C, E, R. M. Bruckmaier, y J. J. Gross Bruckmaier, (2014). Milk production during the colostral period is not related to the later lactational performance in dairy cows. Journal of Dairy Science. 97 :2186–2192, 97, 2186–2192.

Koldovsky, O. (1989). Search for role of milk-borne biologically active peptides for the suckling. *Journal Nutrition*, 119, 1543–1551.

Larson, B., Heary, H., y Devery, J. (1980). Immunoglobulin Production and Transport by the Mammary Gland. *J. Journal of Dairy Science*, 63, 665-671.

Lazzaro, J. (2002). Colostrum / Colostrum Supplementing/Supplements. Shenandoah Dairy Goat. www.saanedoah.com.

Leblanc, S. (2010). Monitoring Metabolic Health of Dairy Cattle in Transition Period. *Journal Reproduction and Development*, 56.

Liu, G.L., J.Q. Wang, D.P. Bu, J.B. Cheng, C.G. Zhang, H.Y. Wei, L.Y. Zhou, Z.F., H. Hu, X.L. Dong. (2009). Factors affecting the transfer of immunoglobulin G1 into the milk of Holstein cows. *The veterinary journal*, 5. 182(1): 79-8.

Malmuthuge, Nilusha, Yanhong Chen, Guanxiang Liang, Laksiri A. Goonewardene, y Le Luo Guan (2015). Heat-treated colostrum feeding promotes beneficial bacteria colonization in the small intestine of neonatal calves. *Journal of Dairy Science.*, pi: S0022-0302(15)00622-0. doi: 10.3168/jd.

McDonald, W. L., O'Riley, J, K., Schroen, J, C., y Condrón, R. J. (2005). Heat Inactivation of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in Milk. *Applied and environmental microbiology*, p. 1785–1789.

McGuirk. (2004). Managing production store and deliver colostrum. *Veterinary Clinics Food Animal Practice* 20, 593-603.

McMartin, S., Godden, S., Metzger, L., Feirtag, J., Bey, R., Stabel, J., Chester-Jones, H. (2006). Heat Treatment of Bovine Colostrum. I: Effects of Temperature on Viscosity and Immunoglobulin G Level. *Journal of Dairy Science*, 89:2110–2118.

Meale, S., Frederique, Chaucheyras-Durand., Berend., Harma, Luo, G. L., y Michael, Steele. (2017). From pre- to postweaning: Transformation of the young calf's gastrointestinal tract. *Journal of Dairy Science*, 100:1–12.

Meléndez, R., Valdivia, A., Rangel, E., Díaz, E., Segura, J., & Guerrero, A. (2010). Abortion risk factors and reproductive performance of dairy cattle in Aguascalientes, México. *Revista Mexicana de Ciencias Pecuarias*, 1(4), 391-402. <http://www.tecnicapecuaria.org.mx/trabajos/201010150259.pdf>

Menares-Arriagada, C. M. (2011). Efecto de uso de calostro comercial sobre la inmunidad pasiva en terneros Holstein nacidos en invierno. Valdivia Chile: Universidad Austral de Chile.

Morin D. E., P. D. Constable, F. P. Maunsell, y G. C. McCoy (2001). Factors associated with colostrum specific gravity in dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 84(4): 937-943.

Nickerson. (1989). Immunological Aspects of Mammary Involution. *Journal of Dairy Science*, 8 72: 1665-167.

NMX-F-368-1983. (1983). Alimentos leche fluida fosfatasa residual método de prueba. México DF: Normas mexicanas dirección general de normas.

Patel, S, Gibbons, J, Wathes, & D.C. (2014). Ensuring optimal colostrum transfer to newborn dairy calves. *Cattle Practice*, volume 22 part 1.

Plaza, K., Martínez, y Ibalmea, Y. (2009.). Respuesta del uso eficiente del calostro en los terneros de una lechería. *Revista Cubana de Ciencia Agrícola.*, Tomo 43, Número 1: 15-18.

Quezada, T., García, V., Ortiz, R., Arredondo, J. L., Medina, L., Valdivia, A., & Montoya, A. (2014). Biochemical parameters in the blood of Holstein calves given immunoglobulin Y-supplemented colostrum. *BMC Veterinary Research*, 159(169), 1-7. doi:10.1186/1746-6148-10-159

Ramos. (1976). C.M Manual de Métodos de Análisis de leche y lactinios. México DF: Ramos.

Romo, Valdivia, A., Carranza, R., Cámara, J., Zavala, M., Flores, E., y Espinosa, J. (2014). Brechas de rentabilidad económica en pequeñas unidades de producción de leche en el altiplano central mexicano. *Revista Mexicana de Ciencias Pecuarias*, 5(4), 273-290. <http://www.tecnicapecuaria.org.mx/publicacion04.php?IdPublicacion=1301>

Roth B. A, Keil, N. M, Gygax, L, y Hillmann E (2009) Influence of weaning method on health status and rumen development in dairy calves *Journal of Dairy Science*. 92:645–656 doi:10.3168/jds.2008-1153

SAGARPA. (2015). Censo anual de Ganado 2015. Censo de Ganado. www.sagarpa.gob.mx/Transparencia/POT.../CuartoInformeDeLabores_SAGARPA.pdf

Soheila, Zarei, G., Reza. Ghorbani, M., Khorvash, O., Martin, A., & Hossein. Mahdavi, A. R. (2017). The Impact of Season, Parity, and Volume of Colostrum on Holstein Dairy Cows Colostrum Composition. *Agricultural Sciences*, 8, 572-581.

Staley, Theodore E., Lane D. Corley, Ixville J. Bush y E. Wy" Jones (1972.). The ultrastructure of neonatal calf intestine and absorption of heterologous proteins. *Anatomical Record*, 172: 559–579.

Sung, Nackmoon y Michael T. Collins, (1998). Thermal Tolerance of Mycobacterium paratuberculosis. *Applied and environmental microbiology*, 999–1005.

Teixeira, A., Bicalho, M., Machado, V., Oikonomou, G., Kacar, C., Foditsch, C., Bicalho, R. (2013). Heat and ultraviolet light treatment of colostrum and hospital milk: Effects on colostrum and hospital milk characteristics and calf health and growth parameters. *The Veterinary Journal*, 197 (2013) 175–181.

Vignoli, R. (1986). Esterilización y Desinfección. *Temas De Bacteriología Y Virología Médica* 33: 609

Weaver et. al, D. T. (2000). Passive transfer of colostral immunoglobulins in calves. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 14: 569–577.

Zurita, L. (1994). Calostro, Fuente de Vida del Recién Nacido. *Chile Agrícola*, 20, 286-288

Anexo B DESCRIPCIÓN DE TÉCNICAS

Anexo B.1. Fosfatasa alcalina

La fosfatasa alcalina es una enzima que está presente en la leche cruda y que en condiciones de tratamiento térmico (pasteurización lenta, rápida o ultrarrápida) se inactivase ha demostrado que esta enzima es más difícil de destruir que la mayoría de los organismos patogénicos termo-resistentes que pudieran estar presentes en la leche, como por ejemplo *Mycobacterium bovis* y *M. avium* y *Micoplasma bovis* (Ramos, 1976), (NMX-F-368-1983, 1983).

Esta prueba es de gran utilidad para decidir si la leche ha sido o no pasteurizada, si la leche pasteurizada se ha mezclado con leche cruda, o incluso si la pasteurización ha sido deficiente y en este caso el calostro; la prueba de fosfatasa alcalina es una reacción de una enzima que cataliza la hidrólisis del enlace éster fosfórico entre un grupo orgánico y un grupo fosforilo a pH alcalino, lo que libera fosfato al medio, que se usa para identificar infecciones en sangre o determinar el nivel de bacterias en leche y crema pasteurizada al ser la fosfatasa sensible al calor, el cual al adquirir un color determina la cualitativamente la carga bacteriana.

La Norma Mexicana establece el procedimiento para determinar la fosfatasa residual en leche fluida. Este método se basa en la hidrólisis del fenil fosfato, que en presencia de la fosfatasa de la leche libera fenol; éste se determina colorimétricamente haciéndolo reaccionar con 2,6 dibromoquinonclorimida (B.Q.C.) obteniéndose un color azul, cuya intensidad se mide con el espectrofotómetro.



Listado del material necesario

Reactivos y materiales:

- Reactivos:
- Agua destilada:
- Solución reguladora de hidróxido de bario - borato, pH 10.6 ± 0.15 a temperatura de 298 K (25°C). Disolver en agua 25 g de hidróxido de bario octahidratado ($\text{Ba}(\text{OH})_2 \cdot 8\text{H}_2\text{O}$) no deteriorado y diluir a 500 cm³; por separado disolver 11 g de ácido bórico (H_3BO_3) y diluir a 500 cm³. Calentar cada una de las soluciones a 323 K (50°C), mezclar, agitar y enfriar cerca de 293 K (20°C); filtrar y conservar el filtrado en un recipiente perfectamente tapado. Cuando se use para leche, diluir 500 cm³ de este regulador con 500 cm³ de agua.
- Solución reguladora para desarrollo de color, pH 9.8 ± 0.15 a temperatura de 298 K (25°C). Disolver 6 g de metaborato de sodio (NaBO_2) y 20 g de cloruro de sodio en

agua y diluir a un litro con agua. 3.1.1.3 Solución reguladora para dilución del color.

Diluir 100 cm³ de la solución anterior (3.1.1.2) a un litro con agua.

- Solución reguladora patrón para calibrar el potenciómetro 0.00996 M, pH 9.183 a temperatura de 298 K (25°C). Disolver 3.80 g de borato de sodio decahidratado (Na₂B₄O₇·10H₂O) en agua y diluir a un litro (en ningún caso debe de secarse esta sal en el horno, antes de emplearse). Para evitar contaminación con el bióxido de carbono (CO₂), mantener perfectamente tapado el recipiente o protegerlo con un tubo de cal sodada. Una vez fuera del envase esta solución reguladora debe utilizarse dentro de los primeros 10 minutos.
- Substrato regulador; para valorar la pasteurización. Disolver 0.10 g de fenil fosfato disódico cristalizado libre de fenol, en 100 cm³ del regulador hidróxido de bario-borato. El fenil fosfato cristalizado debe conservarse siempre en el congelador del refrigerador o en un desecador. En el caso de que el fenil fosfato disódico cristalino (Na₂C₆H₅PO₄), no esté libre de fenol, deberá, ser purificado como sigue: Disolver 0.5 de la sal en 4.5 cm³ de agua; agregar 0.5 cm³ del regulador hidróxido de barioborato y dos gotas del reactivo B.Q.C. dejar en reposo 30 minutos; agregar 2.5 cm³ alcohol butílico y dejar en reposo hasta que se separe el alcohol, con objeto de eliminar el color. Eliminar el alcohol con gotero o pipeta Pasteur. Diluir 1 cm³ de la solución acuosa restante a 100 cm³ con el regulador de hidróxido de bario borato. Calentar la solución de fenil fosfato disódico (0.10 g o bien 2 cm³ de la solución purificada) más borato-hidróxido de bario (100 cm³) a 358 K (85°C) por 2 minutos; tapar inmediatamente y guardar en refrigerador. La solución es estable por un año, si se encuentra bien tapada sin exposición a la atmósfera. Si se requiere, desarrollar el color y re extraerlo antes de uso.
- Para determinaciones en leche cruda La preparación del reactivo, se efectúa como se ha descrito en la valoración de la pasteurización excepto que se disuelven 0.20 g de fenil fosfato disódico o bien se utilizan 2 cm³ de la solución purificada. 3.1.1.6 Reactivo precipitante de proteínas zinc-cobre Disolver 3.0 g de sulfato de zinc heptahidratado (ZnSO₄·7H₂O) y 0.6 g de sulfato de cobre pentahidratado (CuSO₄·5H₂O) en agua y diluir a 100 cm³. 2,6-dibromo-quinonclorimida (B.Q.C.) Disolver 40 mg de polvo de B.Q.C. en 10 cm³ de alcohol etílico absoluto o metanol y conservar esta solución en un frasco gotero ámbar (manteniendo en el congelador del refrigerador), el reactivo es estable durante un mes; no debe usarse cuando se torna color café. El B.Q.C. en polvo debe almacenarse en el congelador del refrigerador o en el desecador. Antes de usarse los nuevos frascos de B.Q.C. deberán ser comprobados preparando curvas

patrón con fenol y con los de la solución en buen estado; hacer esta comprobación cuando menos dos veces por año.

- Solución de sulfato de cobre para patrones (0.5%). Disolver 0.05 g de sulfato de cobre pentahidratado ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) en 100 cm³ de agua destilada. 3.1.1.9 Alcohol butílico
 Emplear alcohol butílico normal, de punto de ebullición 389-391 K (116-118°C). Para ajustar el pH, mezclar en un litro de alcohol, con 50 cm³ de la solución reguladora para desarrollo de color. Conservar en un frasco con tapón de vidrio esmerilado.
- Patrones de fenol; Solución madre pesar exactamente 1.0 g de fenol puro; transferir a un matraz volumétrico de un litro y diluir hasta la marca con agua, mezclar perfectamente (cada cm³ contiene 1 mg de fenol) Esta solución mantenida en el refrigerador es estable durante varios meses.
- Soluciones patrón de comparación Diluir 10 cm³ de la solución madre a un litro con agua y mezclar (1 cm³ contiene 10 microgramos, 0.00001 g). Para preparar patrones más diluidos, diluir 5, 10, 30, y 50 cm³ en 100 cm³ de agua para que contengan respectivamente 0.5, 1.0, 3.0, y 5.0 microgramos o unidades de fenol por centímetro cúbico. Estas soluciones patrón mantenidas en el refrigerador no se deben emplear después de una semana. De manera semejante se preparan las soluciones patrón que contengan 20, 30, y 40 unidades por centímetro cúbico. Para preparar la escala de colores proceder en la siguiente forma: en series de tubos (de preferencia graduados en 5 y 10 cm³) medir volúmenes adecuados de las soluciones patrón, a fin de obtener un margen favorable de patrones según las necesidades. Incluir 0.0 (testigo), 0.5, 1.0, 3.0, 10.0, 20.0, 30.0, y 40.0 unidades. Con objeto de aumentar la intensidad de color azul y la estabilidad de los patrones, agregar a cada tubo 1 cm³ de la solución de sulfato de cobre al 0.05% y a continuación 5 cm³ de la solución reguladora para dilución de color diluyendo el contenido de cada tubo a 10 cm³ con agua. Agregar 4 gotas de 1a solución B.Q.C, mezclar y esperar 30 minutos, a temperatura ambiente para desarrollar el color. En caso de emplear el procedimiento de extracción con alcohol butílico normal, proceder como se indica más adelante. Hacer la lectura de la intensidad del color con espectrofotómetro equipado con filtro de 610 nanómetros, restando el valor, que alcanza la lectura del testigo a la de cada una de las soluciones patrón de fenol correspondientes; finalmente construir la curva estándar (esta curva debe ser línea recta). Si se pretende efectuar una comparación visual de los patrones se conservan en el refrigerador y se prepara una nueva serie cada semana.
- Precauciones generales La homogeneización de la leche para la determinación de fosfatasa es fundamental antes de desarrollar la técnica. Colocar varios cm³ en un tubo de ensayo pequeño, tapar y guardar en el refrigerador si es necesario el empleo

de un conservador agregar cloroformo en concentraciones de 1-3%. 3.2 Materiales · Tubos de ensayo de 15 x 125 mm · Tubos de ensayo con graduación en cm³ (ml) de 0 a 15 · Pipetas de Mohr graduadas en 0.1, 1.0, 5.0 y 10 cm³ · Embudos de filtración, tallo corto · Papel filtro Whatman No. 42 de 9 cm o bien el No. 2 o su equivalente.

- Aparatos y equipo:
- Balanza analítica con ± 0.0001 g de sensibilidad
- Espectrofotómetro o fotocolorímetro apropiado para lecturas en la región visible · Potenciómetro
- Baño termostático con agua controlada a 310-318 K (37-45°C)
- Placa caliente con control termostático

- Procedimiento:
- Medir con una pipeta 1 cm³ de muestra en dos o tres tubos (se necesita un tubo como testigo y se recomienda preparar dos o más tubos para determinaciones por duplicado); en el caso de la leche de cabra, emplear 3.0 cm³ de la muestra; calentar el tubo testigo en un baño de agua a ebullición cubierto, alrededor de un minuto (la temperatura interna del tubo debe estar entre 358-363 K (85-90°C)), dejar enfriar a temperatura ambiente. A partir de esta etapa manejar de igual manera el testigo y las muestras. 5.2 Agregar a cada tubo 10 cm³ de la solución de substrato regulador para valorar la pasteurización o para las determinaciones cuantitativas en leche cruda; tapar los tubos y mezclar (pH 10.0 \pm 0.15). Este substrato, es adecuado para la leche fresca, leche descremada y suero obtenido en la preparación de quesos; para leche vieja o ligeramente agria se utiliza el substrato preparado en la solución reguladora hidróxido de barioborato sin diluir. En el caso de bebidas que contengan chocolate se utiliza el substrato con hidróxido de bario-borato diluido con 1/4 de su volumen de agua; para sueros muy ácidos obtenidos en la preparación de mantequilla, con pH menor a 4.5, se emplea el substrato con solución reguladora hidróxido de bario-borato, pero empleando 26 g de Ba (OH)₂·8H₂O en lugar de 25 g; lo mismo sucede cuando la muestra proviene de leche de cabra, en cuyo caso emplear este regulador. Para resultados cuantitativos exactos en muestras desconocidas, ajustar el pH a 10.0-10.05.
- Inmediatamente después de agregar la solución de substrato incubar los tubos en baño de agua durante una hora a 310-311 K (37-38°C), mezclar o agitar ocasionalmente durante este tiempo. Trasladar los tubos a un recipiente con agua a ebullición durante un minuto (la temperatura del contenido de los tubos, controlada con un termómetro sumergido en un tubo de tamaño y volumen de contenido igual al de los

de la prueba, debe ser de 358-363 K (85-90°C.). Dejar enfriar los tubos a la temperatura ambiente por inmersión en un recipiente de agua fría.

- Agregar con una pipeta 1 cm³ de la solución precipitante de proteínas Zn-Cu, a los tubos que contienen leche fresca, grasa butírica o suero de queso (para leches viejas o ligeramente agrias o sueros áridos, substituir el centímetro cúbico del reactivo precipitante de proteínas con otro preparado con una solución que contenga 6.0 g de ZnSO₄·7H₂O por 100 cm³. Para bebidas con chocolate emplear 1 cm³ de una solución preparada con 4.5 g de ZnSO₄·7H₂O y 0.1 g de CuSO₄·5H₂O en 100 cm³; para leche de cabra usar 1 cm³ de una solución que contenga 7.5 g de ZnSO₄·7H₂O y 0.1 g de CuSO₄·5H₂O a 100 cm³ de agua).
- Mezclar perfectamente el contenido de los tubos. El pH de la mezcla debe estar entre 9.0-9.1; filtrar (emplear embudos de 5 cm de diámetro y papel filtro; recoger 5 cm³ del filtrado en un tubo, de preferencia graduado en 5 y 10 cm³).
- Agregar 5 cm³ de la solución reguladora para desarrollo de color, el pH de la mezcla debe estar entre 9.3-9.4.
- Agregar 4 gotas del reactivo B.Q.C., mezclar y dejar a temperatura ambiente durante 30 minutos para desarrollo de color. En los casos en que se investigue pasteurización deficiente sólo agregar 2 gotas de la solución de B.Q.C.
- Expresión de resultados:
- Determinar la intensidad del color azul con cualquiera de los siguientes métodos:
- Método espectrofotométrico. Leer las intensidades de color del tubo testigo y de las muestras (usando el filtro con máxima transmitancia a 610 nanómetros), restar la lectura del testigo de la lectura del tubo de la muestra y convertir el resultado a unidades de fenol utilizando la curva patrón. Ordinariamente se hace innecesaria la extracción con alcohol butílico cuando se emplea el espectrofotómetro. En los casos en que se emplee la extracción con este alcohol como se señala en la valoración de la pasteurización centrifugar la muestra durante 5 minutos a fin de romper la emulsión y remover el agua suspendida en la capa alcohólica. Después de centrifugar, con una pipeta capilar provista de bulbo de hule, separar todo el alcohol butílico. Filtrar recogiendo el filtrado en la celda del espectrofotómetro y leer con filtro de máxima transmitancia en la región de 650 nanómetros.
- Método visual con escala de patrones Comparar los colores de las muestras que dan más de 5 unidades con los tubos de color que contienen patrones de fenol) Para obtener resultados cuantitativos en aquellos casos en que haya variaciones entre 0.5 y 5 unidades de color, hacer la extracción con alcohol butílico agregando 5 cm³ de alcohol e invirtiendo lentamente varias veces; centrifugar como se señala en el método

anterior, si fuera necesario, para aumentar la claridad de la capa alcohólica y comparar el color con los patrones tratados en igual forma.

- En aquellas pruebas en las que el desarrollo de color se obtengan resultados fuertemente positivos (por ejemplo, con 20 unidades o más) y en las cuales no sean suficientes 4 gotas de la solución B.Q.C., para reaccionar con todo el fenol, hacer diluciones colocando nuevos tubos con volúmenes conocidos que se diluyen a 10 cm³ con la solución reguladora de dilución de color y agregar dos o más gotas de la solución B.Q.C. En cada una de estas pruebas diluir el testigo y tratarlo directamente. De la misma manera en aquellos casos en los que estas nuevas diluciones produzcan nuevamente reacciones fuertemente positivas, todavía será necesario volver a preparar otras diluciones más hasta que el color quede comprendido entre los de la escala o de la curva del espectrofotómetro. Para hacer la lectura final, dejar transcurrir 30 minutos a partir del momento de la adición de la solución de B.Q.C. a fin de que se desarrolle totalmente su color. Multiplicar las lecturas de las diluciones por el factor de dilución por 2 en caso de haber diluido 5 cm³ por 10, para aquella dilución 1:9 cm³ y por 50, en caso de una dilución inicial 1:9 cm³, seguida de otra de 2:8 cm³.
- Cuando se emplea 1 cm³ de la muestra y se agregan 11 cm³ de los reactivos (el volumen total líquido es de 12 cm³, usando 5 cm³ del filtrado) multiplicar el valor de la lectura por la cifra 1.2 a fin de convertir a equivalentes de fenol en 0.5 cm³ de muestra (si se desea, los resultados pueden convertirse a equivalentes de fenol por cm³, multiplicando por 2.4). Los equivalentes de fenol mayores de 2 x 0.5 cm³, o 4 x 1.0 cm³ de muestra indican una pasteurización deficiente en leche de vaca, bebidas con chocolate, mantequilla y suero de queso; equivalentes de fenol mayores de 1 x 1.5 cm³ de muestra indican una pasteurización deficiente en la leche de cabra.
- Equipo

Baño María a 30°C.

Colorímetro ajustado a 405 nm (fototubo normal).

- Material

Pipetas de vidrio (5,0 ml).

Pipeta automática P-1000 (puntas).

Pro pipeta.

Rotulador para vidrio.

Tubos de ensayo de vidrio (1,5x 16 cm) 16 en una gradilla.

Cronómetro.

Tubos especiales para medir en el colorímetro.

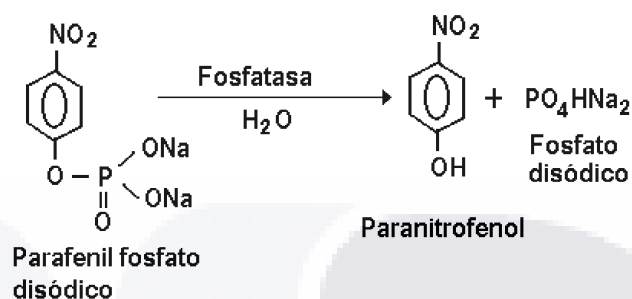
- Reactivos

Tampón de ensayo.

Solución sustrato.

Enzima: fosfatasa alcalina de mucosa intestinal bovina.

Solución para detener la reacción.



Anexo B.2 Inmunodifusión Radial

La prueba de inmunodifusión radial (RID) es una prueba de laboratorio considerada como el “Estándar de Oro” para la medición funcional de IgG en el calostro, es más costosa, con mano de obra intensiva y tarda 18 horas para mostrar resultados (fuente); es una técnica de análisis inmunológico de tipo semi-cuantitativo que detecta la cantidad de anticuerpos en líquidos biológicos, en este caso la concentración de IgG que hay en el calostro bovino, el anticuerpo en suspensión se mezcla con agar impregnado en antígeno ya solidificado. Con este propósito se hacen pozos o pocillos que contendrán la muestra de calostro, se deja incubar para que la IgG permee por la placa de agar y reaccione con el antígeno presente en la placa después de 18 a 24 horas se observara el precipitado, producto de la reacción entre antígeno e IgG que se muestra en la placa como una línea blanca rodeando los agujeros, el diámetro del círculo es la correlación de la concentración de IgG que tendrá la muestra de calostro, de modo que a mayor diámetro, mayor concentración de este anticuerpo (Tizard 1989).

Inmunodifusión Radial Simple — SRID KITS (Cada placa es de 24 pocillos, 3 pocillos son para sueros de referencia). Bovino IgG 1 placa Ref. 728411

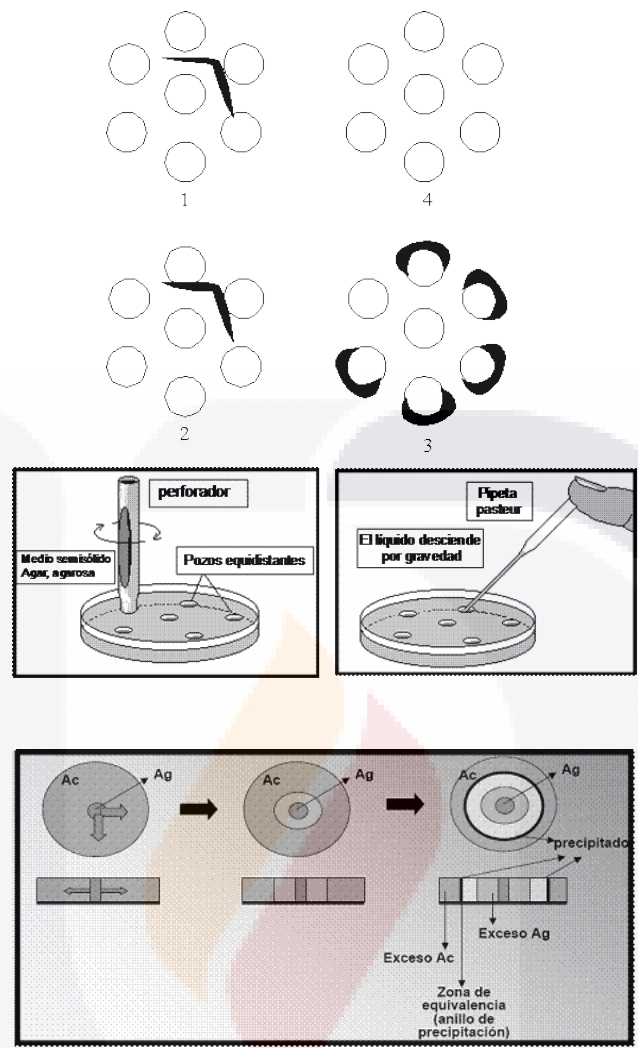
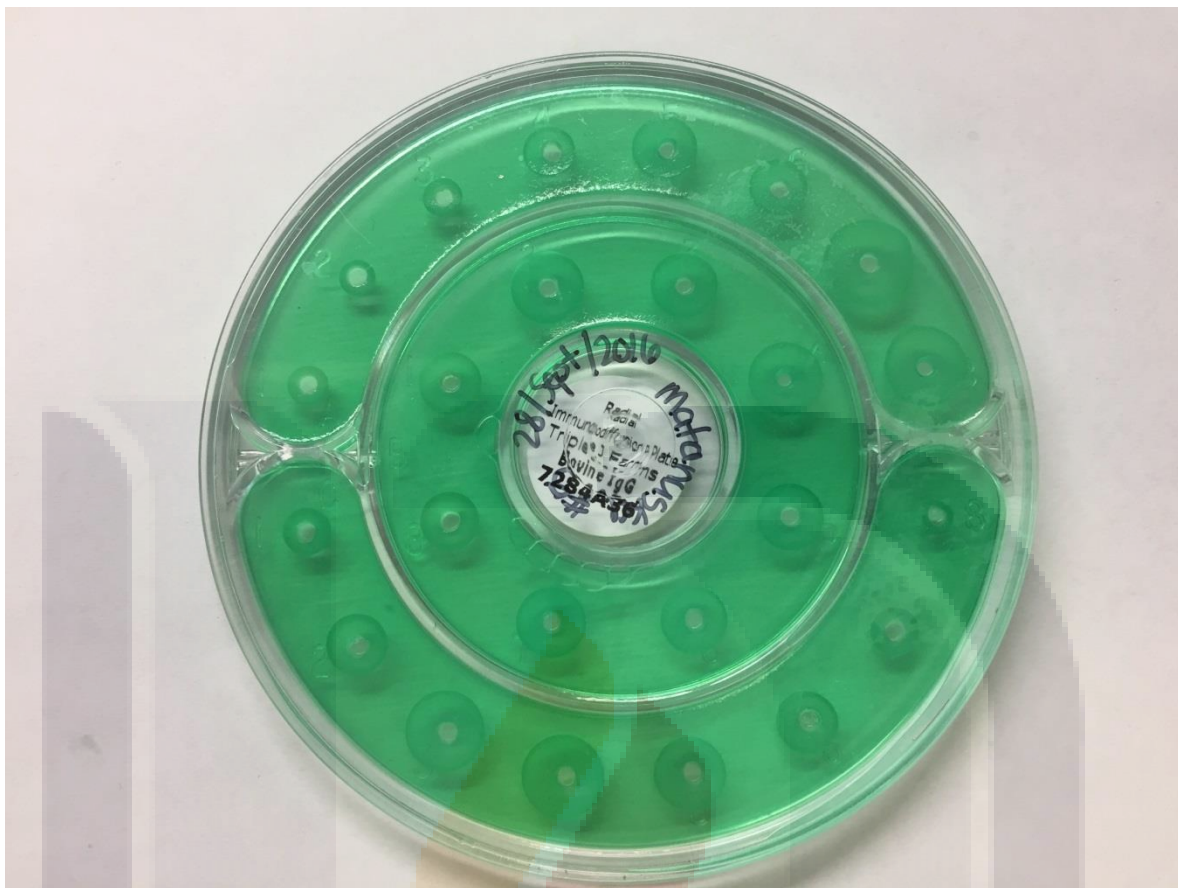
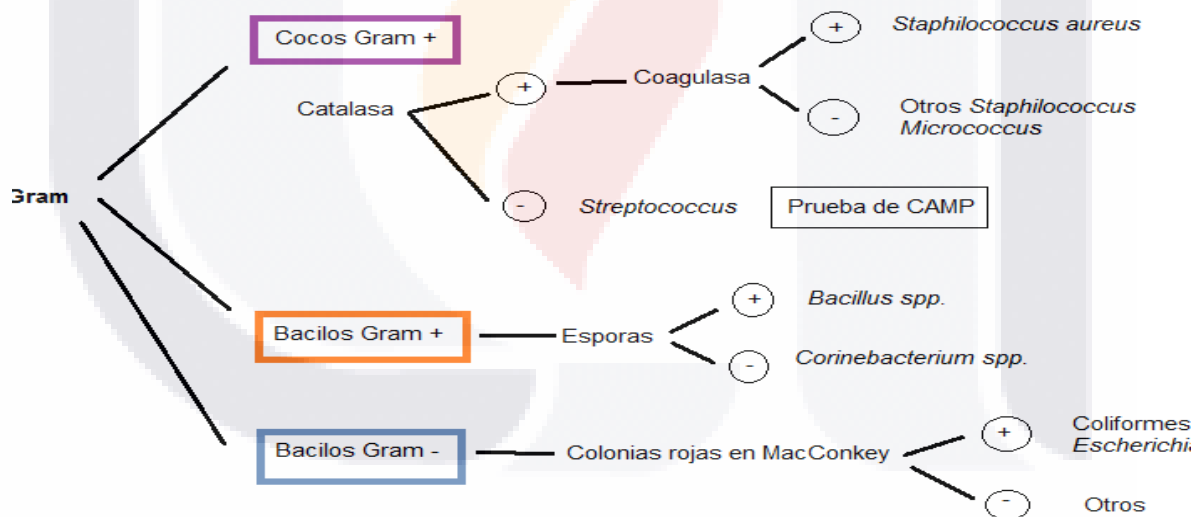


Figura 19. Ejemplo de respuesta para prueba Inmunodifusión radial



Anexo B.3 Pruebas Bacteriológicas

El conteo bacteriano observo la cantidad de la población total bacteriana, el cual se determinó por diversas técnicas con diferentes tipos de medida: cuenta celular (directamente al microscopio o mediante un contador electrónico de partículas o indirectamente con la cuenta de colonias), masa celular (en forma directa pesando el contenido celular del nitrógeno o indirectamente por turbidimetría, proporcional al número de células) y actividad celular (indirectamente relacionando el grado de actividad bioquímica al tamaño de la población bacteriana). Existen varios medios diferenciales, en la práctica rutinaria se usa conteo en caja de Petri; es el método más usado para contar bacterias, se compone de un caldo de cultivo con microorganismos que es diluido y posteriormente las muestras del mismo son distribuidas en la caja de Petri contenedora de agar, por lo que cada célula se dividirá en sus múltiples alrededores para producir colonias separadas en el agar, a cada célula se le es llama unidad formadora de colonias (UFC), al pasar las primeras 24 horas de incubación, el número de colonias se reflejará en el número de células UFC originalmente presentes y así cada 24 horas para presuponer el tipo de bacterias en crecimiento .



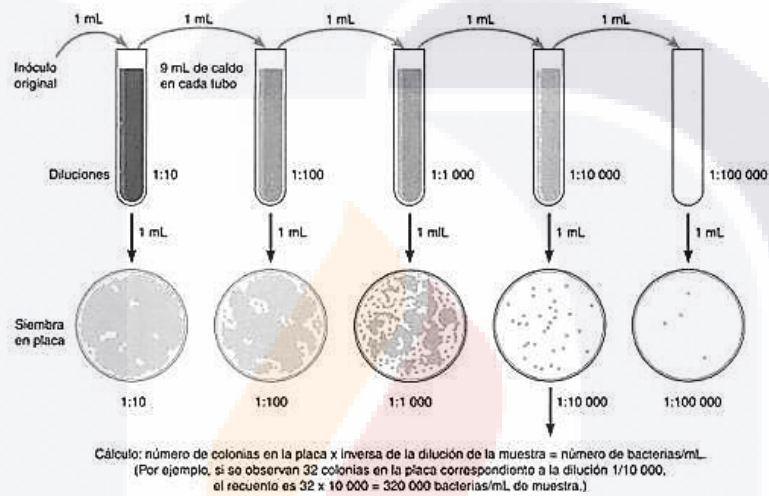
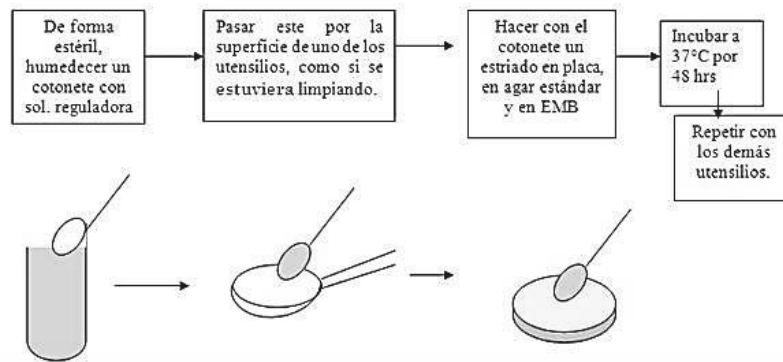
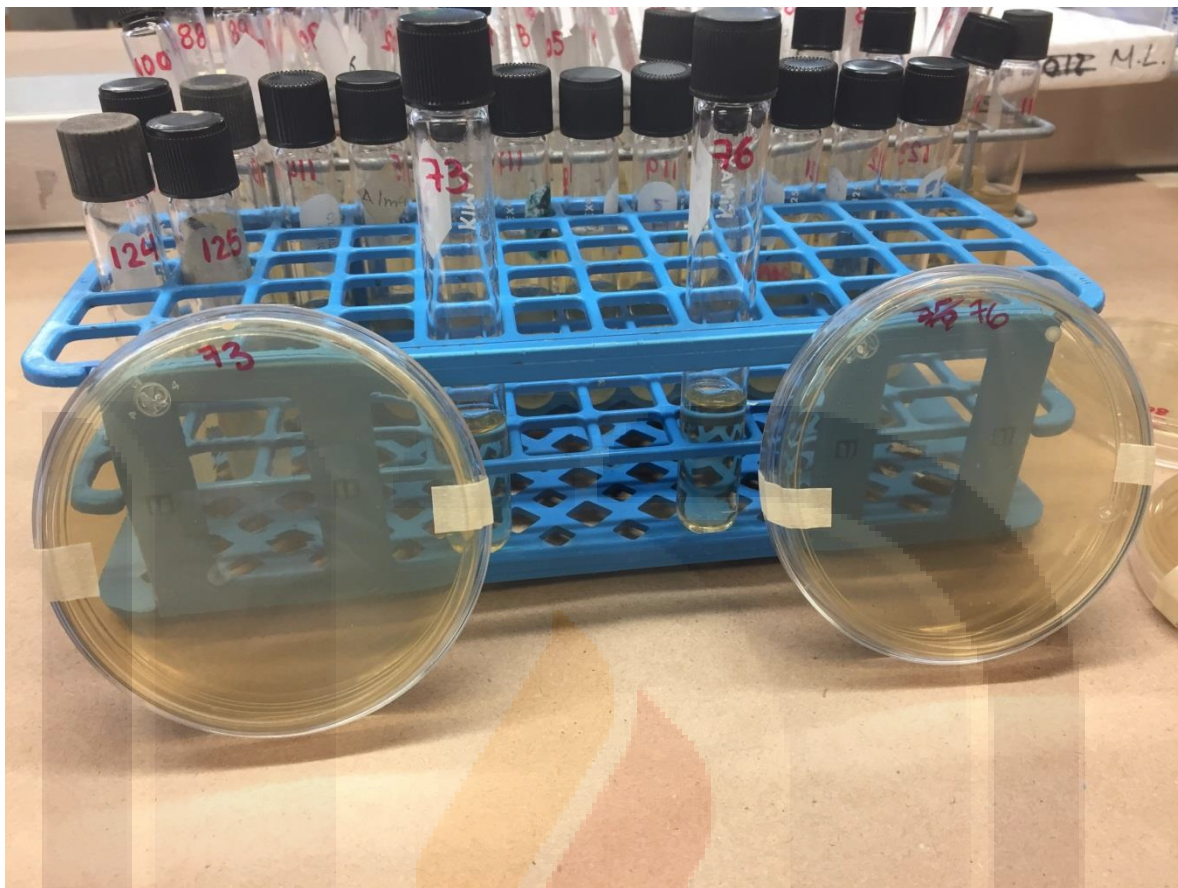


Figura. Ejemplo siembra en agar por dispersión celular. Ejemplo de respuesta para prueba cultivo en agar para UFC (Fuente)



Anexo B.3.1 Caldo Agar Tripticasa

Caldo Trípticasa, es un medio de uso general que se utiliza en procedimientos cualitativos para el cultivo de microorganismos exigentes y no exigentes a partir de una variedad de muestras clínicas y no clínicas

Características

Bacto™ caldo de soya tríplica

Apariencia Deshidratada: Beige claro y fluido, homogéneo.

Solución: solución de 3,0 %, soluble en agua purificada a calentamiento. La solución es de color ámbar claro, claro.

Apariencia de preparación: ámbar claro, claro.

Reacción de 3,0 % Solución a 25 °C: pH 7,3 ± 0,2

BBL™™ Trypticase Soy Broth

Apariencia Deshidratada: Fine, homogéneo, libre de material extraño.

Solución: solución de 3,0 %, soluble en agua purificada a calentamiento. La solución es la luz, tan a amarillo, transparente o ligeramente turbio.

Apariencia de preparación: Luz, color canela a amarillo, transparente o ligeramente turbio.

Reacción de 3,0 % Solución a 25 °C: pH 7,3 ± 0,2

Fórmula

Bacto™ caldo de soya tríplica (soya - caseína Resumen Medio) Fórmula aproximada * por litro

Digerido pancreático de caseína	17,0 g
Papaico Recopilación de soya	3,0 g
Dextrosa	2,5 g
Cloruro de Sodio	5,0 g
Fosfato dipotásico	2,5 g

Modo de Preparación del producto deshidratado

- Suspender el polvo en 1 L de agua purificada:

Bacto™ caldo de soya tríplica - 30 g;

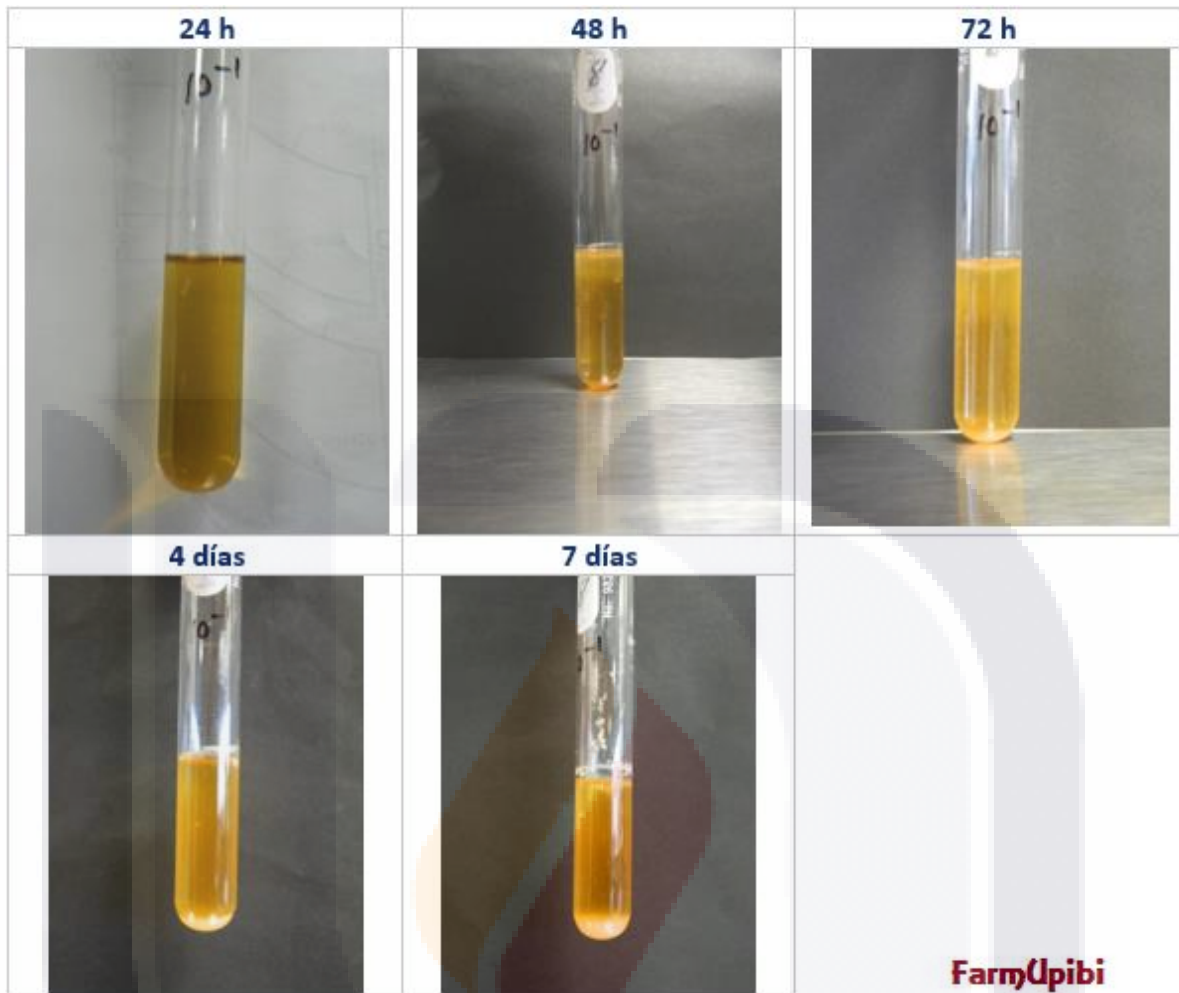
BBL™™ Trypticase Soy Broth - 30 g;

- Mezclar bien.
- Calentar suavemente hasta disolución completa.

- Autoclave a 121 ° C durante 15 minutos.
- Proceder a sembrar con una asada de la muestra con el mechero encendido
- Reposar para cultivo 24 y 48 horas a 37.5 G Celsius

Se observó la turbidez de manera cualitativa para proceder al siguiente paso de cultivo toda muestra que se consideró positiva a turbidez.





FarmUpibi

Anexo B.3.2 Cultivo siembra Agar Tripticasa, Identificación por Tinción e Identificación Morfológica por Microscopio

Medio de cultivo Agar Tripticasa de Soya

Es un medio de cultivo recomendado para el desarrollo y aislamiento de toda clase de bacterias, grampositivas y gramnegativas aerobias.

MATERIALES REQUERIDOS

1. Asas Bacteriológicas
2. Guantes Estériles
3. Tapabocas
4. Estufa a 37°C5.
5. Mechero de Bunsen.

6. Cajas de Petri

7. Asa.

8. Medio.

METODOLOGÍA

Principio del método

El agar tripticasa de soya garantiza el crecimiento de todos los microorganismos de importancia microbiológica tanto Gram positivos como Gram negativos, hongos y levaduras, este medio tiene múltiples usos puede ser utilizado para el monitoreo microbiológico de áreas y superficies, para el mantenimiento de cepas ATCC y para el análisis de aguas y alimentos. El agar tripticasa de soya contiene caseína digerida con enzimas pancreáticas 5.0 g. caseína digerida con papaína 5.0 g. Cloruro de Na 5.0 g Agar 15.0 g pH final (7.3 +/- 0.2).

CRITERIOS DE DESEMPEÑO Y LIMITACIONES DEL MÉTODO

El agar Tripticasa de Soya debe permitir el crecimiento abundante de todos los microorganismos en estudio después de 18 horas de incubación en atmósfera de aerobiosis.

PREPARACIÓN DE LOS REACTIVOS

La placa de agar tripticasa de Soya viene lista para ser utilizada.

CONDICIONES DE ALMACENAMIENTO Y ESTABILIDAD DE LOS REACTIVOS

El medio agar tripticasa de soya debe conservarse a T ° de 4-8°C colocando las placas en posición invertida para evitar que el agua de condensación pueda caer sobre la superficie del medio. Este producto debe manipularse con cuidado evitando movimientos bruscos o caídas que puedan resquebrajar la capa del medio.

La congelación arruina totalmente el medio

Conservado en condiciones óptimas el medio es estable hasta la fecha de expiración señalada.

PROCEDIMIENTO

Cualquier muestra puede ser procesada en este medio y puede sembrarse por diferentes métodos:

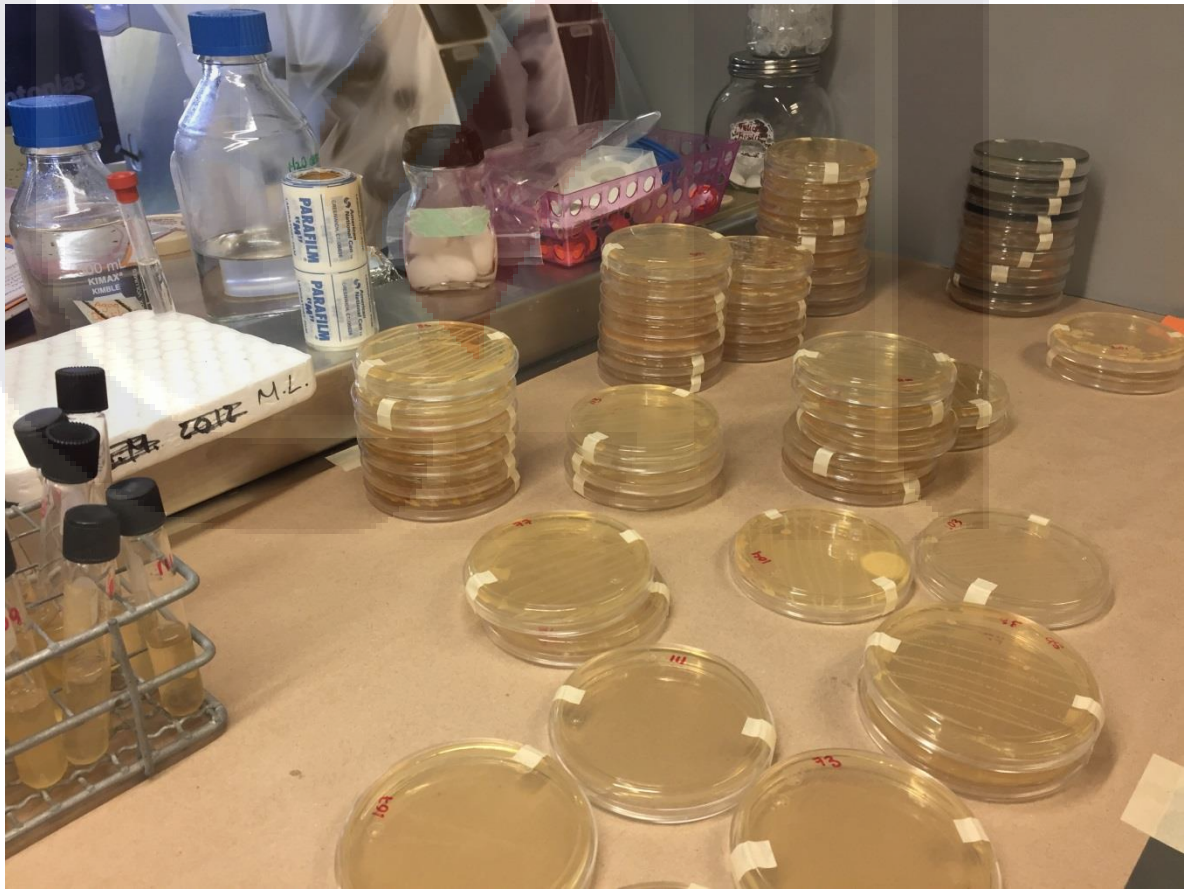
:1- Con asa bacteriológica estéril trabajando siempre a la llama del mechero, tomar una mínima muestra

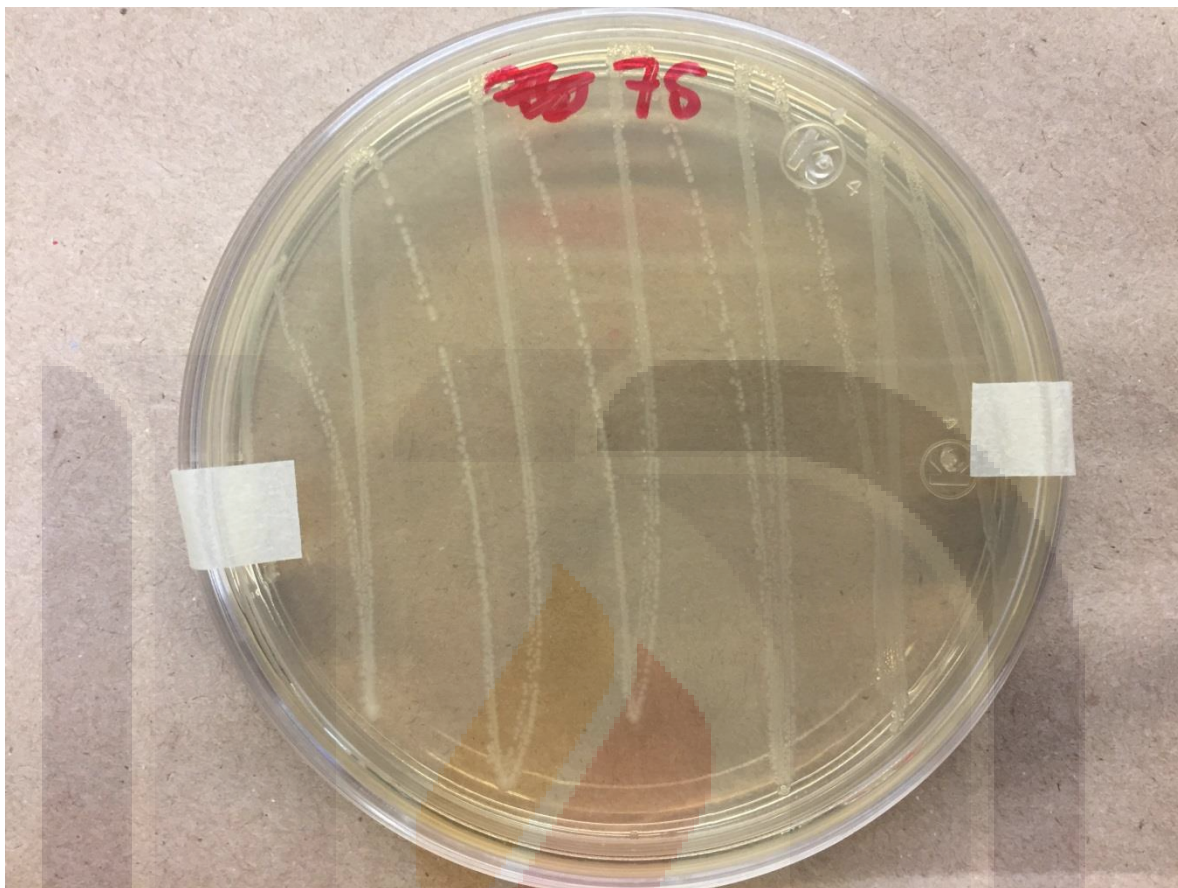
.2. Sembrar suavemente sobre la superficie tersa del medio por el procedimiento de agotamiento.

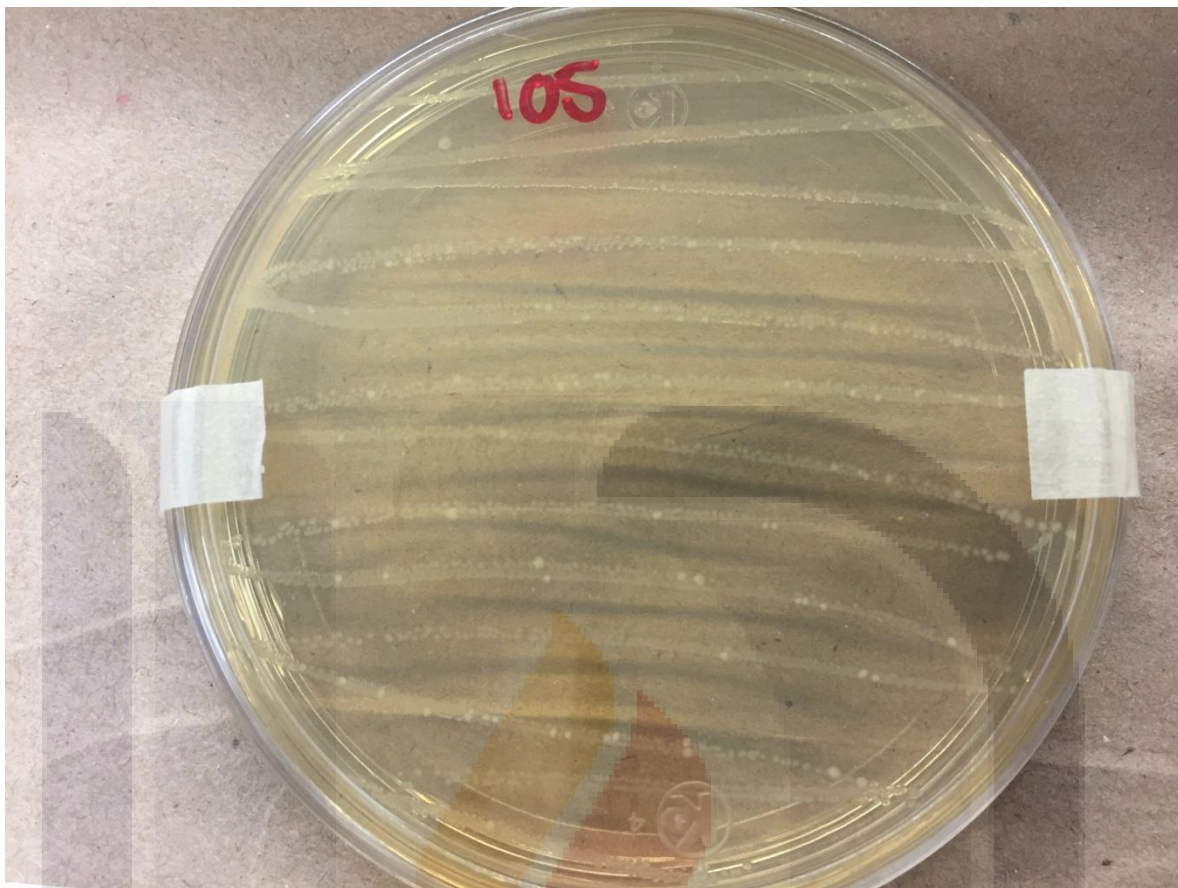
Anexo B.3.3 Tinción Gram

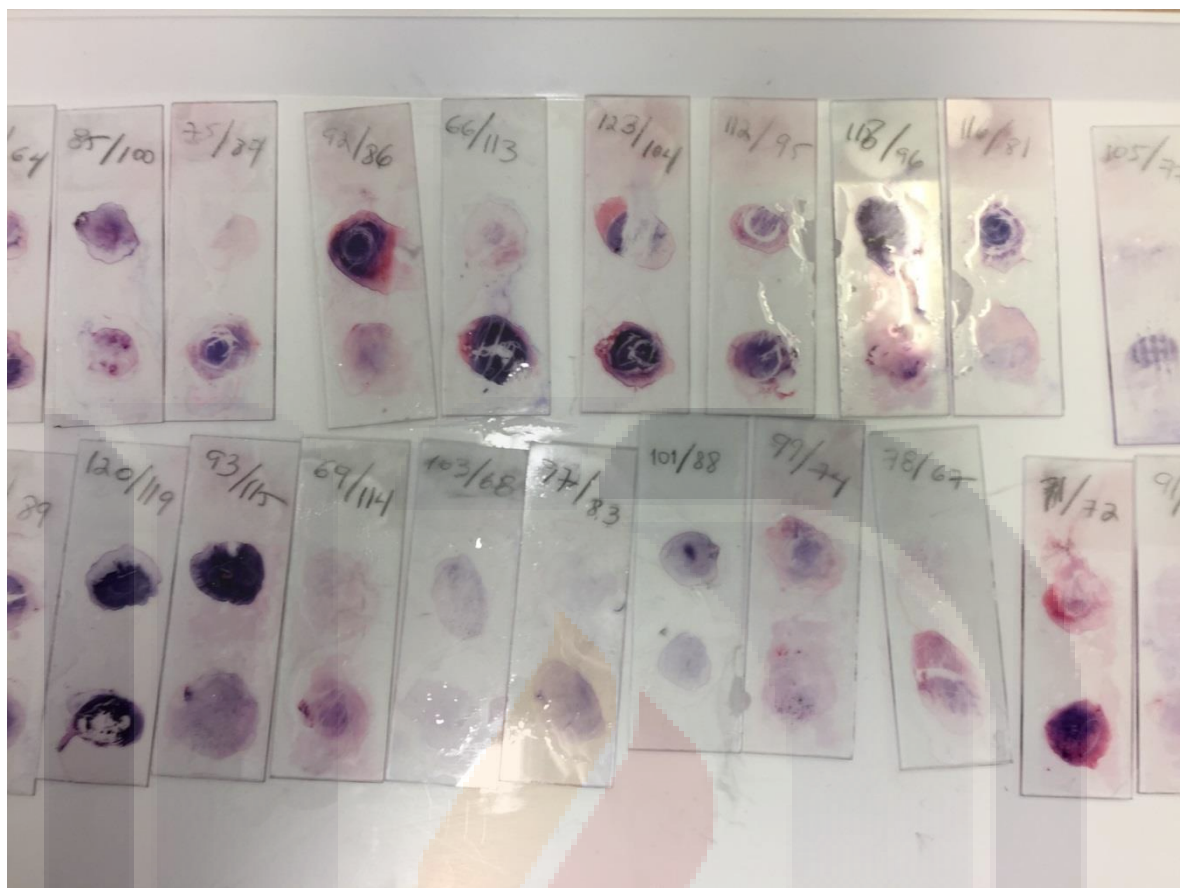
1- En una laminilla se colocó una gota de agua destilada

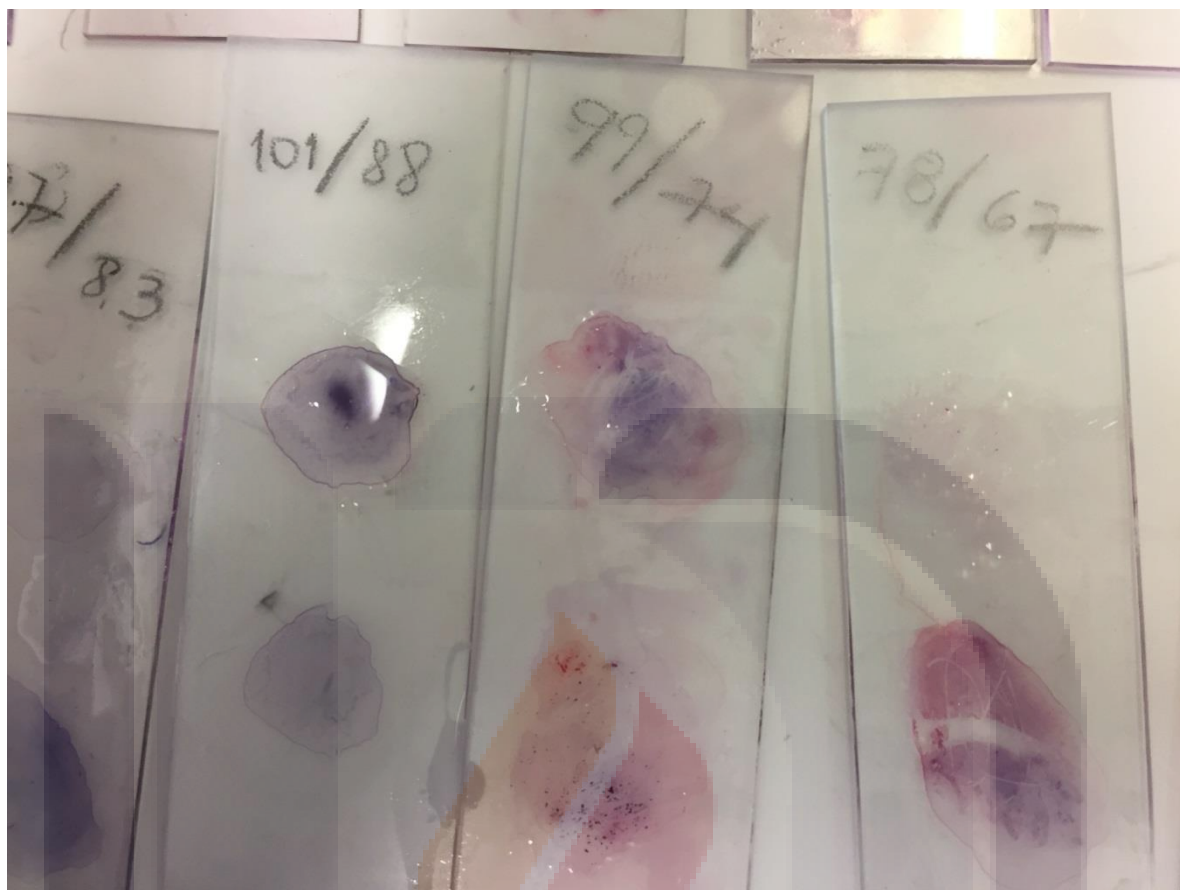
- 2- Mezclo en la gota 1 asada de cultivo bacteriano y se extendió para formar una capa delgada.
- 3- Se dejó secar la laminilla a temperatura ambiente.
- 4- Se pasó 3 veces la laminilla sobre la flama de mechero con la muestra hacia arriba.
- 5- Se colocó sobre la muestra cristal violeta y se reposo 2 minutos.
- 6- Se lavó con H₂O corriente y se sacudió.
- 7- Se colocó Lugol y se reposo 1 minuto.
- 8- Se lavó con H₂O corriente y sacudió.
- 9- Se colocó alcohol-acetona y se reposo 3-5 segundos.
- 10- Se lavó con H₂O corriente y sacudió.
- 11- Se colocó Fucsina y se reposo 15 segundos.
- 12- Se lavó con H₂O corriente y se secó el exceso de H₂O.
- 13- Se Observó a 100x.
- 14- Se identificó el color morado de Gram + y color Rosa para Gram -.
- 15- Se identificó morfológicamente la Bacteria coco Brucella.

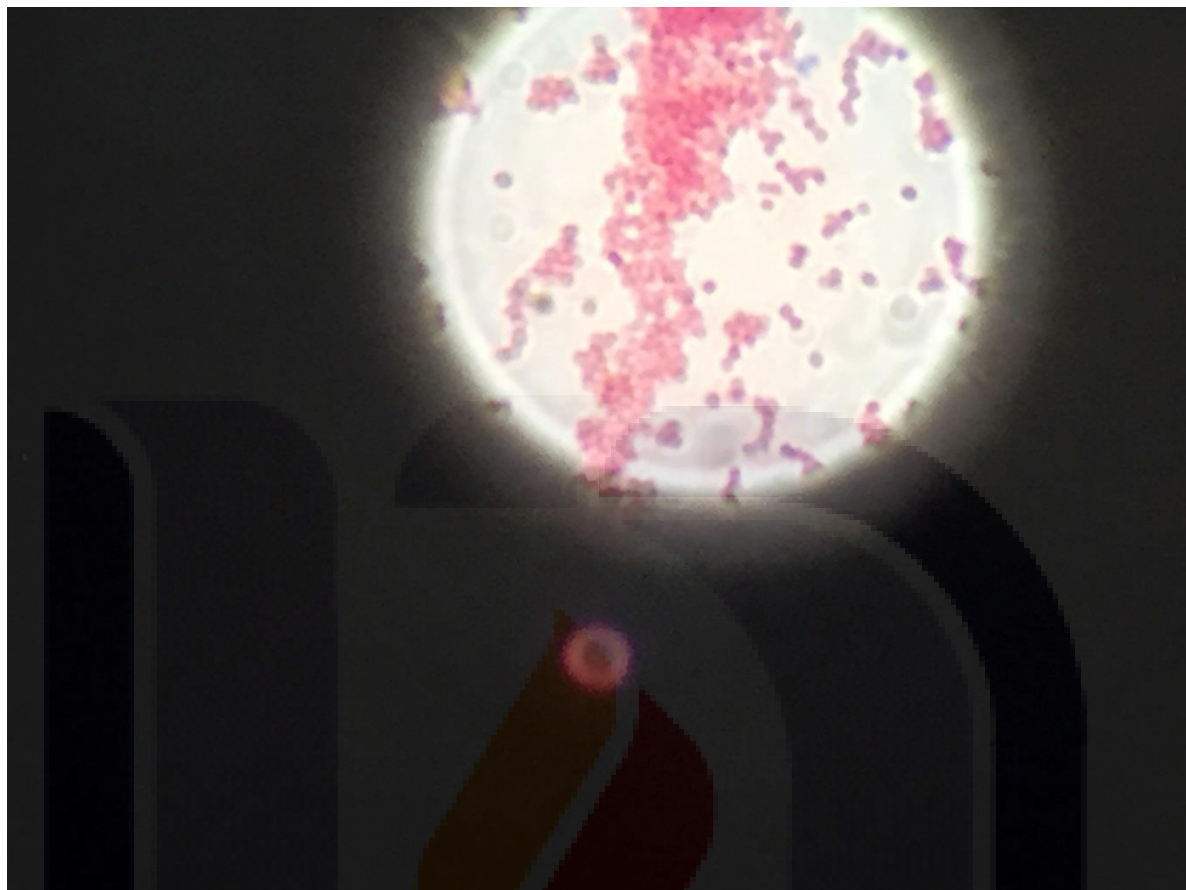


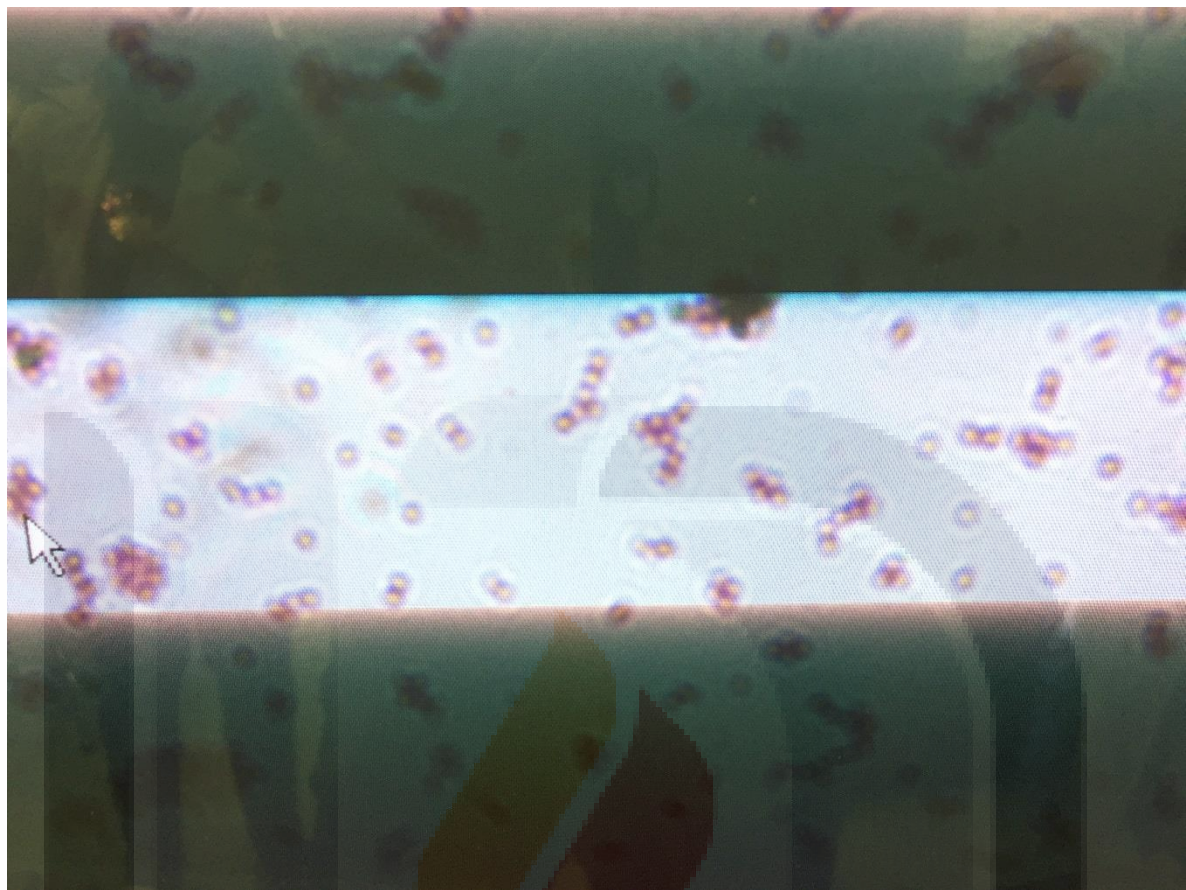












Anexo C CONGRESOS Y PUBLICACIONES

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE AGUASCALIENTES

La Universidad Autónoma de Aguascalientes otorga la presente

OSGRADOS

CONSTANCIA

a:

MVZ. JORGE EDUARDO PONCE HERNÁNDEZ, DR. ARTURO GERARDO VALDIVIA FLORES, DR. FRANCISCO JAVIER PADILLA RAMÍREZ, DR. ABNER JOSUÉ GUTIÉRREZ CHÁVEZ

por su participación en la **Modalidad de Ponencia**, en la mesa de **Ciencias Agropecuarias**



CONGRESO INTERNACIONAL LA INVESTIGACIÓN EN EL POSGRADO

"Se Lumen Proferre"

Aguascalientes Ags., a 11, 12 y 13 de Octubre de 2017

[Signature]
Dr. en C. Francisco Javier Avelar González
Rector

[Signature]
Dra. María del Carmen Martínez Serna
Directora General de Investigación y Posgrado

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE AGUASCALIENTES

CONACYT

La Universidad Autónoma de Aguascalientes y el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología
Otorgan la presente


CONSTANCIA

a:

MVZ. JORGE EDUARDO PONCE HERNÁNDEZ

DR. ARTURO GERARDO VALDIVIA FLORES

Por su participación en la **Modalidad de Ponencia**, en la mesa de **Ciencias Agropecuarias**.



7mo CONGRESO INTERNACIONAL LA INVESTIGACIÓN EN EL POSGRADO

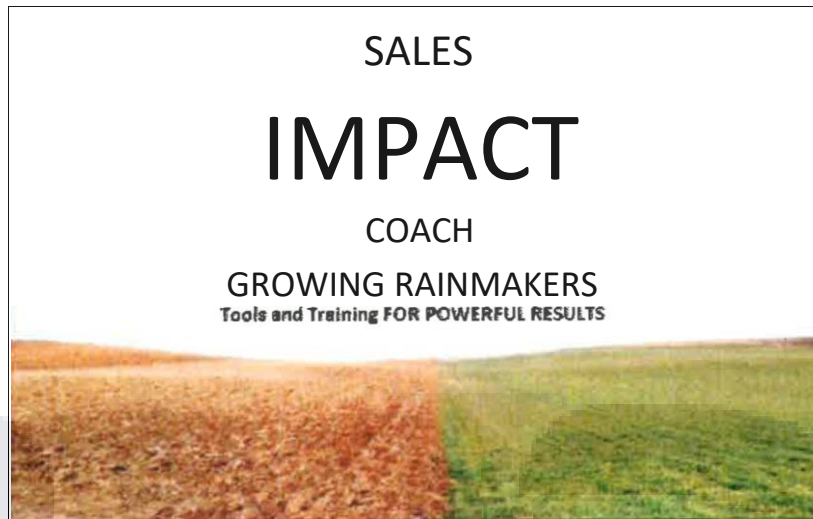
"Se Lumen Proferre"

Aguascalientes Ags., 13 de Octubre de 2016

[Signature]
M. en Admón. Mario Andrade Cervantes
Rector

[Signature]
Dra. Guadalupe Ruiz Cuellar
Directora General de Investigación y Posgrado

OSGRADOS



MOVING THE SALES PROCESS
Suspect to Lead
Lead to Prospect
Prospect to Customer

Presented by:

123

Dave Wilens Impact Sales Coach, Inc.

EDUARDO PONCE HERNANDEZ Completed the

SOCL Sales Process Training Oct 13/2016

C. Strategy

GRPros.v2/161612

Marketing Associate



Impact Sales Coach 2201 Francisco Dr. Suite 140-364 El Dorado Hills CA 95762 916-705-21

Impact Sales Coach 2201 Francisco Dr. Suite 140-364 El Dorado Hills CA 95762 916-705-2191



16° CONGRESO INTERNACIONAL DE MVZ Especialistas en Bovinos
 "MVZ Mario Enrique Vázquez Salinas"
 20 aniversario

LA ASOCIACIÓN DE MÉDICOS VETERINARIOS ZOOTECNISTAS ESPECIALISTAS EN BOVINOS DE LA COMARCA LAGUNERA, A.C.

Otorga la siguiente

CONSTANCIA

A:
Jorge Eduardo Ponce Hernández

Como ASISTENTE en el 16° Congreso Internacional de Médicos Veterinarios Especialistas en Bovinos realizado los días 9, 10 y 11 de noviembre del 2016 con una duración de 24 horas.

CERTIFICADO POR

Concervet
 Consejo Profesional de Certificación de Médicos Veterinarios Especialistas en Bovinos de la Comarca Lagunera, A.C.

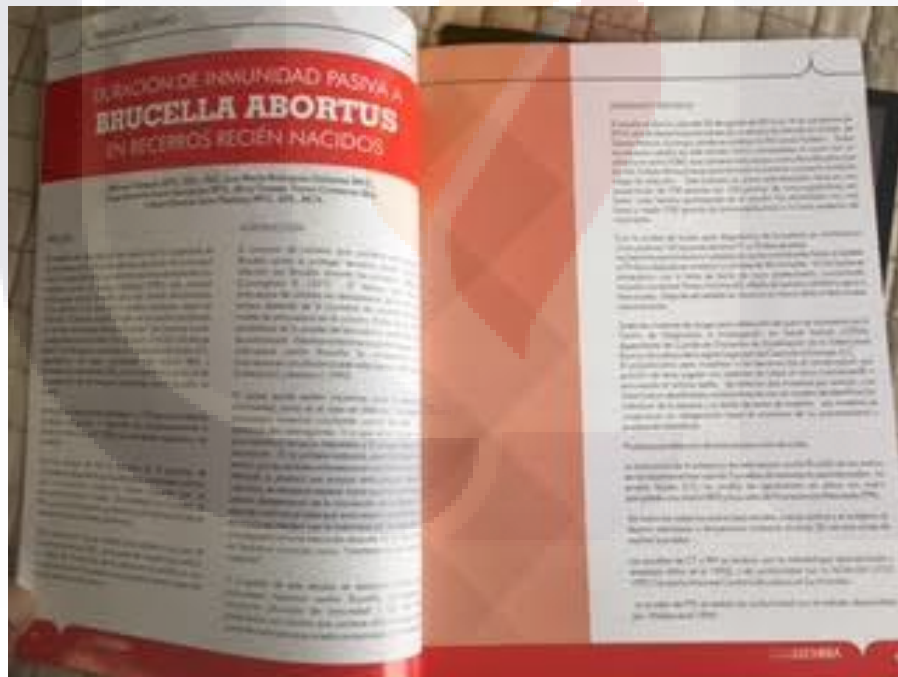
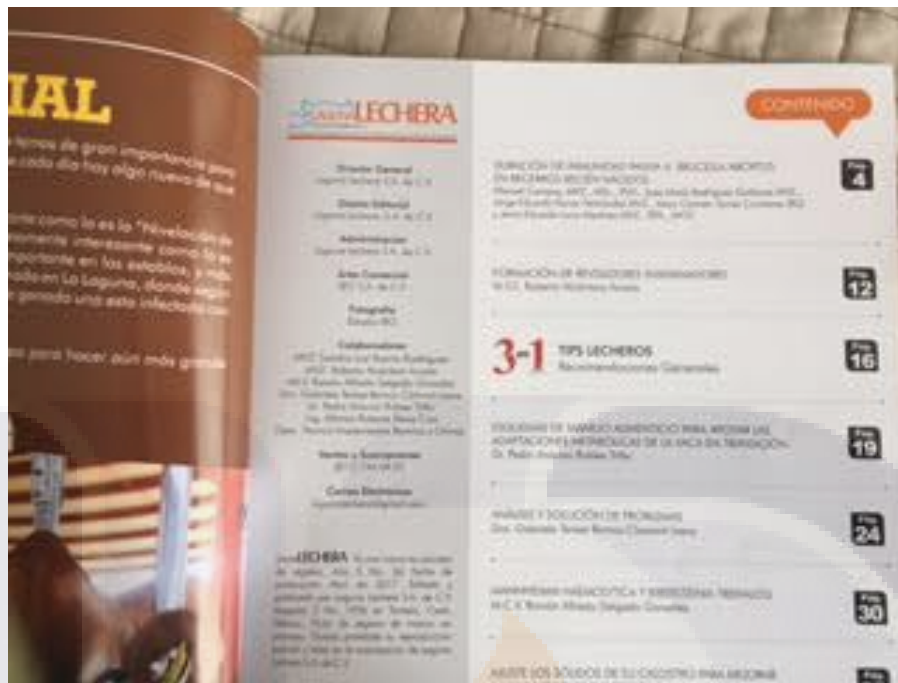
CONCERVET BV 017/16
 Torreón, Coah; a 11 de noviembre de 2016.

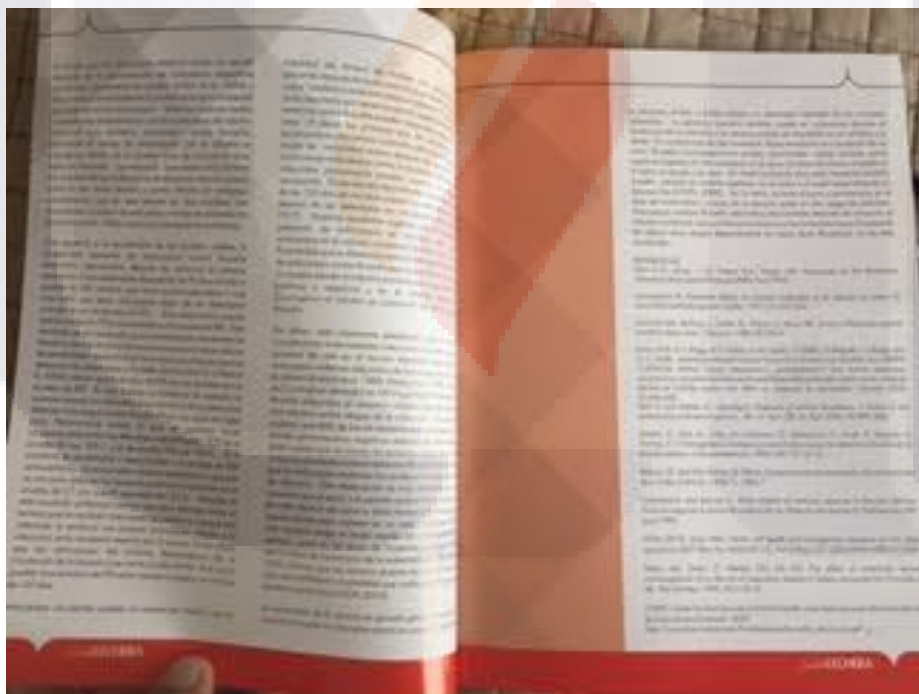
Ramón A. Delgado A.
 MVZ. MC. Ramón Alfredo Delgado González
 Presidente

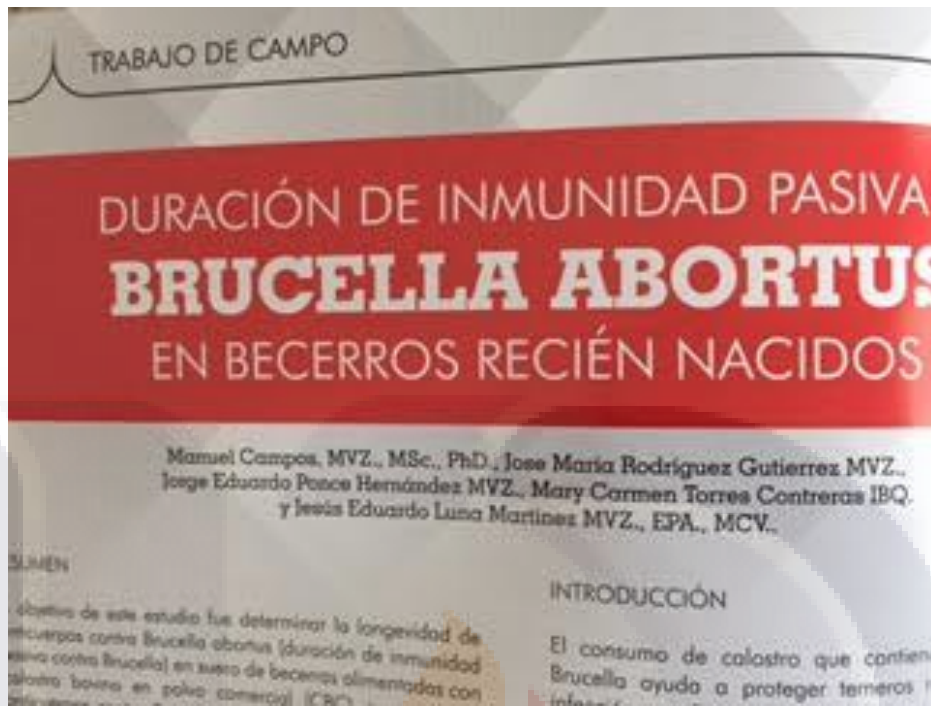
Esteban Zatarain
 MVZ-EPAB Fernando Esteban Zatarain Hernández
 Vicepresidente

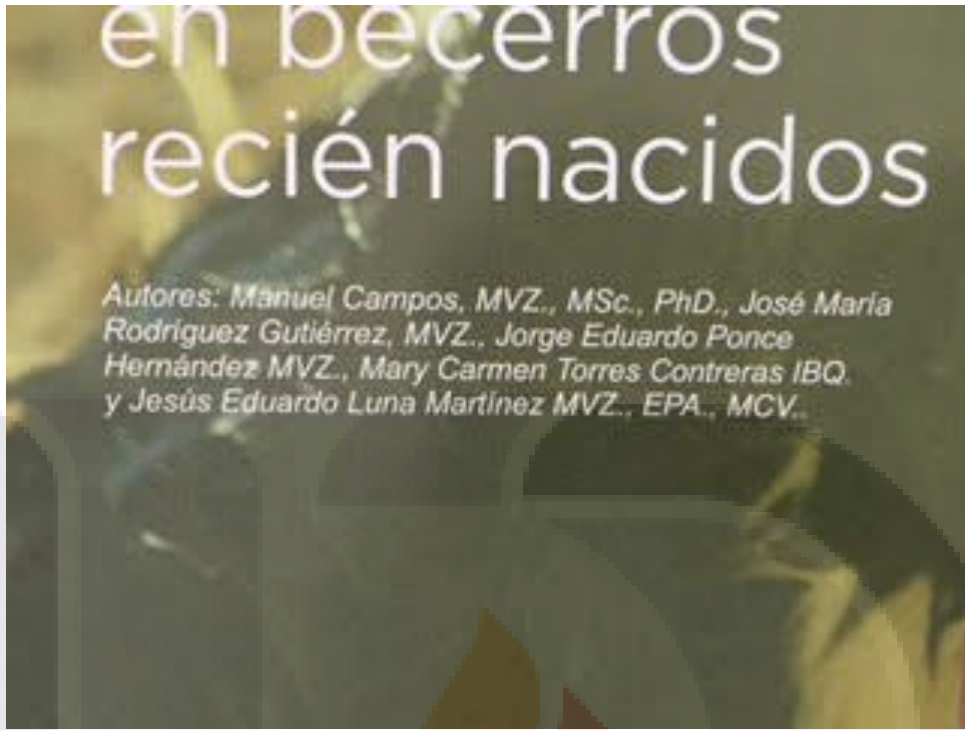
J. Sánchez
 MVZ. MA. Arturo C. Sánchez Mejorada Porras
 Secretario



















WORLD ANGUS SECRETARIAT MEXICO 2015

CHIHUAHUA • DURANGO • MAZATLÁN / SINALOA

Octubre / October 2015

Chihuahua Oct. 14-18

Durango Oct. 18-22

Mazatlán, Sinaloa Oct. 22-24

Pre Tour Oct. 12-14 / Post Tour Oct. 25-27

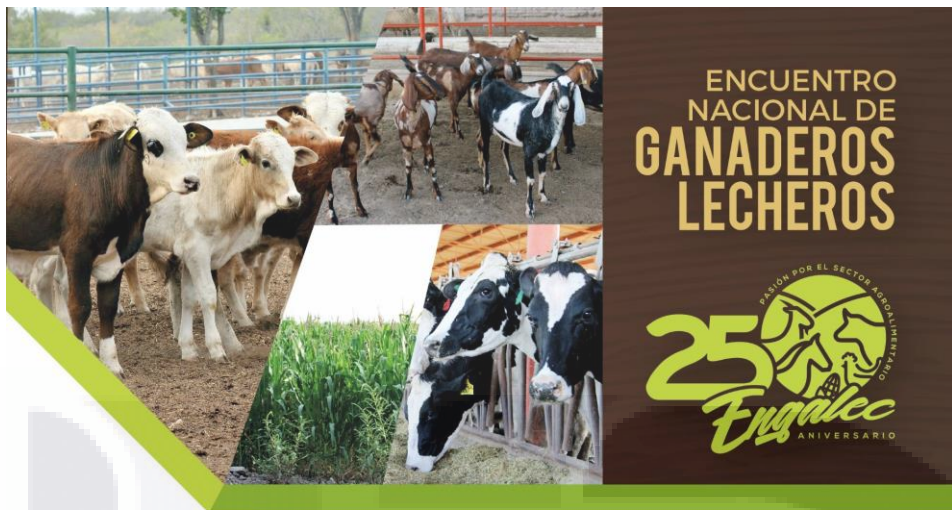
Otorga el presente reconocimiento a:

por su valiosa participación en el WAS México 2015

Billy Estrada
Presidente Asociación Angus Mexicana



Este programa es público, ajeno a cualquier partido político. Queda prohibido el uso para fines distintos a los establecidos en el programa



otorga la presente

CONSTANCIA

a

por su asistencia al ciclo de conferencias
realizadas los días 9, 10 y 11 de marzo de 2017.

Dr. Pedro Manuel Facio Lícera
Director de Extensión y Graduados
del Tecnológico de Monterrey, Campus Laguna



Torreón, Coahuila; México



La siguiente constancia se entrega a

JORGE EDUARDO PONCE HERNANDEZ

Por su participación en el
2do Foro Internacional Metabólico Lechero
celebrado el día
29 de septiembre de 2016



Sede



UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA
Real Universitaria de Jalisco



tratar bien







OTORGA EL PRESENTE

RECONOCIMIENTO

AL M.V.Z. JORGE EDUARDO PONCE HERNANDEZ
Por su participación en el curso de Inseminación Artificial, con la
ponencia: INTERPRETACION DE CATALOGOS

Sañ Juan de los Lagos, Jalisco. Noviembre 2016

L.C.P. LUIS ROGELIO LOZANO FLORES
GERENTE COOPERATIVA PEDRO EZQUEDA

P.T. JOSÉ FELIX MARQUEZ MUÑOZ
PRESIDENTE COOPERATIVA PEDRO EZQUEDA

MVZ TOBIAS IBARRA ALVAREZ
ASESORIA TECNICA UCCA

MVZ OSCAR DE LUNA MATA
ASESORIA TECNICA COOPERATIVA PEDRO EZQUEDA

JUNTOS HACIA UNA CULTURA DE CALIDAD TOTAL, EN BENEFICIO DE LOS GANADEROS



LA ASOCIACIÓN DE MÉDICOS VETERINARIOS ZOOTECNISTAS ESPECIALISTAS EN BOVINOS DE LA COMARCA LAGUNERA, A. C.

Otorga la siguiente

CONSTANCIA

A: *Jorge Eduardo Ponce Hernández*

Como ASISTENTE en el 16° Congreso Internacional de Médicos Veterinarios Especialistas en Bovinos realizado los días 9, 10 y 11 de noviembre del 2016 con una duración de 24 horas.



CONCERVET BY 017/16
Torreón, Coah; a 11 de noviembre de 2016.

MVZ. M.C. Ramón Alfredo Delgado González
Presidente

MVZ-EPABIFernando Esteban Zatarain Hernández
Vicepresidente

MVZ. MA. Arnela C. Sánchez Mejorada Porras
Secretario