



Maestría Interinstitucional en Producción Pecuaria (MIPPE)

EFFECTO DE LA PASTEURIZACIÓN DE CALOSTRO BOVINO SOBRE SUS PROPIEDADES FISICOQUÍMICAS, SANITARIAS E INMUNOLÓGICAS

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
MAESTRO EN CIENCIAS PECUARIAS.

PRESENTA:

ELENA CAROLINA GONZÁLEZ CORTÉS

DIRECTOR DE TESIS: DR. ARTURO GERARDO VALDIVIA FLORES

COMITE TUTORIAL:

DR. MARIO NOA PÉREZ

DR. ABNER JOSUÉ GUTIÉRREZ CHÁVEZ

GUADALAJARA, JALISCO. DICIEMBRE DEL 2015.

“Nuestra recompensa se encuentra en el esfuerzo y no en el resultado.

Un esfuerzo total es una victoria completa.”

-Mahatma Gandhi-

DEDICATORIAS

A Dios y a Nuestra Señora de San Juan de los Lagos por haberme puesto en este camino de aprendizaje.

A mis padres Gil y María Elena, a mis hermanas Claudia y Berenice, a mi tía Rosario y al resto de mi familia, por su apoyo incondicional y sus valiosos consejos.

A Paulina, Luz, Karla, Elsie y Diana por su comprensión, por escucharme y por hacer de cada momento una experiencia tan grata. A todos mis amigos que pacientemente me apoyaron.

AGRADECIMIENTOS

Este protocolo de tesis de maestría se desarrolló gracias a la participación de los Doctores que forman parte del Comité tutorial de la MIPPE: Dr. Mario Noa Pérez, Dr. Arturo Gerardo Valdivia Flores, Dr. Abner Josué Gutiérrez Chávez, quienes asesoraron el proyecto desde la concepción de la idea, la ejecución, el análisis teórico y hasta la redacción definitiva del presente documento.

Se reconoce el apoyo financiero del Consejo Nacional De Ciencia y Tecnología (registro de becario no. 547205).

Agradezco a la Universidad de Guadalajara: al departamento de Salud Pública y el laboratorio de Microbiología. A la Universidad Autónoma de Aguascalientes: a la MC Fabiola del Rocío Villalobos Gómez del departamento de Clínica Veterinaria, a la Dra. María Carolina de Luna López del Laboratorio de Investigación de la Posta Zootécnica. Gracias por permitirme trabajar en sus instalaciones, por su paciente capacitación y su admirable vocación de servicio y docencia.

A todos mis profesores que me impartieron clases que fueron y serán parte de mi formación.

Al Sr. Juan José Romo, al M.V.Z. Refugio Padilla y todo su maravilloso equipo en el área de crianza de becerras que hicieron posible la realización de este proyecto. También al MVZ Alejandro Muñoz por el apoyo en campo y todos mis colegas veterinarios que directa o indirectamente aportaron algo en este trabajo.

A mis compañeros de la MIPPE: gracias por su amistad, apoyo y por hacer más ameno el camino.



Dr. DR. JAVIER LONGINO PADILLA RAMÍREZ
COORDINADOR DE POSGRADO DEL CUCBA, UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA
MAESTRÍA INTERINSTITUCIONAL EN PRODUCCIÓN PECUARIA
P R E S E N T E

Por medio del presente y con base en el reglamento de la Maestría Interinstitucional en Producción Pecuaria, le comunico que he revisado la propuesta de tesis que presenta la egresada **MVZ Elena Carolina González Cortés**, intitulado:

“EFECTO DE LA PASTEURIZACIÓN DE CALOSTRO BOVINO SOBRE SUS PROPIEDADES FÍSICOQUÍMICAS, SANITARIAS E INMUNOLÓGICAS”

En mi opinión, como Tutor designado de la MVZ Elena Carolina González Cortés, dicho trabajo de investigación cumple con los requisitos del programa. Por lo que le informo que no tengo ningún inconveniente en emitir mi **VOTO APROBATORIO** para que ella pueda proceder a imprimirla y continuar con el procedimiento administrativo para la obtención del grado de Maestra en Producción Pecuaria.

Pongo lo anterior a su digna consideración y sin otro particular por el momento le envío un cordial saludo.

A T E N T A M E N T E

“Se Lumen Proferre”

Aguascalientes, Ags., a 2 de septiembre de 2015

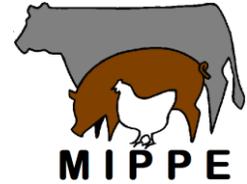


DR. ARTURO GERARDO VALDIVIA FLORES

Tutor de la candidata

Se extiende el presente documento para los fines administrativos que al interesado convengan.

c.c.p.- Interesado
c.c.p.- Secretaría de Investigación y Posgrado
c.c.p.- Jefatura del Depto. de Clínica Veterinaria
c.c.p.- Minuta Secretario Técnico



Maestría Interinstitucional en Producción Pecuaria (MIPPE)

DR. JAVIER PADILLA RAMÍREZ
COORDINADOR DE POSGRADO
MAESTRÍA INTERINSTITUCIONAL
EN PRODUCCIÓN PECUARIA.

PRESENTE:

Con base en el reglamento de la Maestría Interinstitucional en Producción Pecuaria, le comunico que he revisado el trabajo de tesis que presenta la M.V.Z. Elena Carolina González Cortés, para obtener el grado de Maestro en Producción Pecuaria, con el título:

“EFECTO DE LA PASTEURIZACIÓN DE CALOSTRO BOVINO SOBRE SUS PROPIEDADES
FISICOQUÍMICAS, SANITARIAS E INMUNOLÓGICAS”

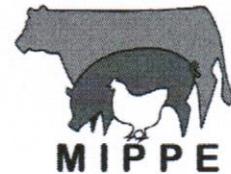
En mi opinión, dicho trabajo de investigación que presenta el candidato cumple con los requisitos del programa, por lo que otorgo el VOTO APROBATORIO, para que pueda ser sustentado en el examen de grado correspondiente.

Se extiende la presente el día 2 de Septiembre del 2015, para los fines administrativos que al interesado convengan.

ATENTAMENTE

DR. MARIO NOA PÉREZ
PTC. UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA

Ccp. ARCHIVO



Maestría Interinstitucional en Producción Pecuaria (MIPPE)

DR. JAVIER PADILLA RAMÍREZ
COORDINADOR DE POSGRADO
MAESTRÍA INTERINSTITUCIONAL
EN PRODUCCIÓN PECUARIA.
PRESENTE:

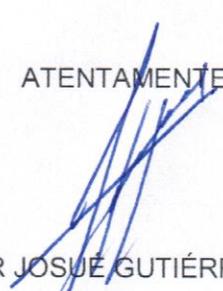
Con base en el reglamento de la Maestría Interinstitucional en Producción Pecuaria, le comunico que he revisado el trabajo de tesis que presenta la M.V.Z. Elena Carolina González Cortés, para obtener el grado de Maestro en Producción Pecuaria, con el título:

“EFECTO DE LA PASTEURIZACIÓN DE CALOSTRO BOVINO SOBRE SUS PROPIEDADES
FISICOQUÍMICAS, SANITARIAS E INMUNOLÓGICAS”

En mi opinión, dicho trabajo de investigación que presenta el candidato cumple con los requisitos del programa, por lo que otorgo el VOTO APROBATORIO, para que pueda ser sustentado en el examen de grado correspondiente.

Se extiende la presente el día 2 de Septiembre del 2015, para los fines administrativos que al interesado convengan.

ATENTAMENTE


DR. ABNER JOSUÉ GUTIÉRREZ CHÁVEZ
PTC. UNIVERSIDAD DE GUANAJUATO

Ccp. ARCHIVO

ÍNDICE GENERAL

	Pág.
Índice de cuadros	3
Índice de figuras	4
Abreviaturas usadas.....	5
RESUMEN	7
ABSTRACT	8
1. INTRODUCCIÓN	9
2. HIPÓTESIS	13
3. OBJETIVOS	13
3.1. OBJETIVO GENERAL.....	13
3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	13
4. REVISIÓN DE LA LITERATURA	14
4.1. TRANSFERENCIA DE INMUNIDAD PASIVA MADRE- TERNERO.....	14
4.2. CARACTERÍSTICAS GENERALES DEL CALOSTRO.....	18
4.3. COMPOSICIÓN DEL CALOSTRO BOVINO	19
4.4. CONSERVACIÓN DE CALOSTRO BOVINO	24
4.5. DETERMINACIÓN DE LA CALIDAD DEL CALOSTRO	29
5. MATERIALES Y MÉTODOS	31
5.1. ÁREA DE ESTUDIO	31
5.2. METODOLOGÍA DE TRABAJO.....	32
5.3. DETERMINACIÓN DE PROPIEDADES FISICOQUÍMICAS, SANITARIAS E INMUNOLÓGICAS.....	33
5.4. IGG EN SUERO SANGUÍNEO	35
5.5. PROCEDIMIENTOS DE PASTEURIZACIÓN.....	35
5.6. INDICADORES DE SALUD EN LA BECERRA	37

5.7.	DISEÑO EXPERIMENTAL Y ANÁLISIS ESTADÍSTICO	38
6.	RESULTADOS	40
6.1.	CONTEO DE CÉLULAS SOMÁTICAS	40
6.2.	PROPIEDADES FISICOQUÍMICAS DEL CALOSTRO.....	40
6.3.	PROPIEDADES INMUNOLÓGICAS DE CALOSTRO.....	41
6.4.	PROPIEDADES SANITARIAS DEL CALOSTRO	42
6.5.	PARÁMETROS DE SALUD DE LAS BECERRAS	43
7.	DISCUSION	44
8.	CONCLUSION	46
9.	LITERATURA CITADA.....	47
10.	ANEXOS	56
10.1.	ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	56
10.2.	DETERMINACIÓN DE PROTEÍNAS POR KJELDAHL	71
10.3.	GRASA BUTÍRICA (NOM-155-SCFI-2012)	74
10.4.	REFRACTÓMETRO BRIX.....	78
10.5.	REFRACTÓMETRO DE MANO	79
10.6.	CALOSTRÓMETRO	80
10.7.	CUANTIFICACIÓN DE IgG EN LECHE Y SANGRE. ELABORACION DE CURA PATRÓN.....	81
10.8.	METODOLOGÍA DE TURBIDEZ CON SULFATO DE ZINC.....	84
10.9.	DETERMINACION DE GÉNERO DE BACTERIAS. PRUEBAS BIOQUÍMICAS PRIMARIAS	85
10.10.	RECuento DE COLIFORMES (GUIA PETRIFILM™).....	88
10.11.	RECuento DE AEROBIOS (GUIA PETRIFILM™).....	91
10.12.	INMUNODIFUSIÓN RADIAL	94

Índice de cuadros

Cuadro 1. Porcentaje de absorción de Inmunoglobulinas según la edad del ternero.....	16
Cuadro 2. Composición nutricional del calostro bovino, leche de transición y leche entera.	20
Cuadro 3. Composición de las inmunoglobulinas presentes en el calostro bovino y leche de bovino.....	21
Cuadro 4. Métodos de selección de calidad de calostro en campo.....	32
Cuadro 5. Métodos de determinación de propiedades fisicoquímicas, sanitarias e inmunológicas en calostro bovino.	33
Cuadro 6. Resultados de PCM.....	40
Cuadro 7. Resumen del análisis estadístico para propiedades fisicoquímicas del calostro.	41
Cuadro 8. Resumen del análisis estadístico para propiedades inmunológicas del calostro.....	41
Cuadro 9. Resultado de género y especie de pruebas bioquímicas.....	42
Cuadro 10. Resumen del análisis estadístico para propiedades sanitarias del calostro.	42
Cuadro 11. Resumen del análisis estadístico para ganancias de peso diarias en becerras.	43

Índice de figuras

Figura 1 Placentoma de bovino.	14
Figura 2 Estructura química de la IgG.	15
Figura 3 Patrón de concentración de inmunoglobulina G en suero en los terneros que muestran concentraciones crecientes después de la alimentación del calostro.....	16
Figura 4 Concentración de IgG en el suero sanguíneo de terneras alimentadas con tres cantidades diferentes de calostro.....	18
Figura 5 Ubicación geográfica del Municipio de Lagos de Moreno, Jalisco.	31
Figura 6 Esquema de identificación de grupos.....	32
Figura 7 Esquema pruebas bioquímicas.	34
Figura 8 Espectrofotómetro.	35
Figura 9 Pasteurización de calostro en laboratorio.....	36
Figura 10 Pasteurizador de calostro en campo.	36
Figura 11. Bolsas utilizadas para la pasteurización de calostro en campo.....	37

Abreviaturas usadas

Abreviatura	Significado
°C	Grados Celsius.
ANDEVA	Análisis de varianza.
BMA	Bacterias mesofílicas aerobias.
COFOCALEC	Consejo para el Fomento de la Calidad de Leche y sus Derivados.
CTP	Coliformes totales en placa.
CUCBA	Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias.
DCA	Diseño experimental Completamente al Azar.
dL	Decilitro.
Fc	Fragmento cristalizante (de inmunoglobulina).
FC	Valor de F calculada.
FcRn	Receptor de Fc.
Ft	Valor de F de tablas.
FTP	Falla en la transferencia de inmunidad pasiva.
GPD	Ganancia de peso diaria.
h	Horas.
Ha	Hipótesis alterna.
Ho	Hipótesis nula.
Ig	Inmunoglobulina.
IgA	Inmunoglobulina A.
IGF-1	Factor de crecimiento tipo insulina-1.
IGF-2	Factor de crecimiento tipo insulina-2.
IgG	Inmunoglobulina G.
IgG1	Inmunoglobulina G isotipo 1.
IgG2	Inmunoglobulina G isotipo 2.
IgM	Inmunoglobulina M.
LF	Lactoferrina.
LP	Lactoperoxidasa.

mg	Miligramos.
MHC	Complejo mayor de histocompatibilidad.
mL	Mililitros.
NMX	Norma Mexicana.
NOM	Norma Oficial Mexicana.
PCM	Prueba de California para Mastitis.
PT	Proteína total.
SAGARPA	Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación.
SIAP	Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera.
UFC	Unidades Formadoras de Colonias.

Efecto de la pasteurización de calostro bovino sobre sus propiedades fisicoquímicas, sanitarias e inmunológicas.

González Cortés Elena Carolina, Valdivia Flores Arturo Gerardo, Noa Pérez Mario y Gutiérrez Chávez Abner Josué.

RESUMEN

El calostro bovino es la primera leche secretada por la glándula mamaria después del parto y se considera una fuente importante de inmunoglobulinas y nutrientes para que la ternera pueda adaptarse al medio después del nacimiento y la protegen contra las enfermedades hasta que desarrolle una inmunidad activa. El buen manejo del calostro es esencial para proveer una buena carga de Ig a los terneros recién nacidos, bajando así la mortalidad y morbilidad de los animales que están en periodo de crianza. La pasteurización de calostro es un proceso que permite la reducción en los organismos patógenos que pueden enfermar a los reemplazos. El objetivo de este estudio fue evaluar el efecto de la pasteurización sobre algunas propiedades fisicoquímicas, sanitarias e inmunológicas del calostro bovino. El experimento se realizó en un establo lechero, se tomaron un total de 100 muestras de calostro bovino y 100 muestras de suero sanguíneo de crías, distribuidas en dos grupos: el grupo control y el grupo de tratamiento. Se pasteurizó el calostro a 60°C durante 60 minutos en un pasteurizador de marca comercial. Las muestras de calostro tratadas y sin tratar fueron analizadas para determinar porcentaje de sólidos totales, grasa y proteína; conteo de BMA, conteo de coliformes en placa e identificación de género y especie de bacterias. Las concentraciones de IgG fueron medidas utilizando la técnica de Inmunodifusión radial. Los resultados del estudio mostraron que la pasteurización de calostro tuvo una reducción significativa de cuentas bacterianas conservando sus niveles de IgG y que la eficacia para la absorción por las beceras fue multifactorial.

Palabras clave: Calostro bovino, inmunoglobulina, beceras, inmunidad.

Effect of pasteurization on the physicochemical, sanitations and immunological properties
of the bovine colostrum.

González Cortés Elena Carolina, Valdivia Flores Arturo Gerardo, Noa Pérez Mario and
Gutiérrez Chávez Abner Josué.

ABSTRACT

Bovine colostrum is the first milk secreted by the mammary gland after birth and is considered an important source of immunoglobulins and nutrients for the calf to adapt to the environment after birth and protect against disease until it develops an active immunity. The right colostrum management is essential to provide a load of immunoglobulins newborn calves, thus lowering mortality and morbidity of animals in breeding period. Colostrum pasteurization is a process that enables reduction in pathogens that can sicken replacements. The objective of this study was to evaluate the effect of pasteurization on some physic-chemical properties, health and immune bovine colostrum. The experiment was conducted in a dairy farm; a total of 100 samples of colostrum and 100 blood serum samples of calves, distributed in two groups, were taken: the control group and the treatment group. Colostrum at 60 °C for 60 min was pasteurized in a commercial pasteurizer. Samples of treated and untreated colostrum were analyzed for percentage of total solids, fat and protein, aerobic mesophilic bacteria count, coliforms count and identification of genus and species of bacteria. IgG concentrations were measured using radial immunodiffusion technique. Study results showed that pasteurization of colostrum had significantly reduced bacterial counts maintaining their levels of IgG and efficiency for absorption by calves is multifactorial.

Keywords: Bovine colostrum, immunoglobulin, calves, immunity.

1. INTRODUCCIÓN

El calostro bovino es la secreción de la glándula mamaria obtenida en el periodo comprendido de 5 días antes a 5 días después del parto, que difiere de la leche principalmente por su alto contenido de anticuerpos (inmunoglobulinas), células somáticas, cloruros y la presencia de eritrocitos y cuyo color va del amarillo al rosado (NOM-155-SCFI-2012).

El calostro bovino contiene proteínas, aminoácidos esenciales y no esenciales, ácidos grasos, lactosa, vitaminas, minerales (Kehoe *et al.*, 2007) y sustancias bioactivas (transferrina, lactoferrina, citoquinas, factores de crecimiento y las inmunoglobulinas) (Sacerdote *et al.*, 2013).

En el calostro bovino existen tres tipos de inmunoglobulinas (Ig): G, M y A. La distribución de las diferentes clases de Ig en el calostro es variable entre vacas. Las IgG, IgA e IgM típicamente contabilizan aproximadamente 85%, 5% y 7% del total de Ig en el calostro, respectivamente (Elizondo-Salazar, 2007).

Las terneras recién nacidas dependen de la absorción de las inmunoglobulinas (Igs) presentes en el calostro dentro de las primeras horas de vida para protegerse contra enfermedades infecciosas en la etapa temprana de vida (Godden *et al.*, 2012), este proceso es conocido como transferencia de inmunidad pasiva (Elizondo-Zalazar, 2014)

A pesar de que las otras clases de Ig tienen importantes roles fisiológicos, la predominante cantidad de IgG hace que la medida de la concentración de IgG total o IgG1 en el suero sanguíneo sea un indicativo adecuado de la transferencia de inmunidad pasiva y se ha demostrado que la concentración de IgG en sangre de terneras está claramente asociada con la sobrevivencia y salud de las mismas (Elizondo-Salazar, 2007).

El sistema inmune de la ternera al nacimiento es inmaduro e incapaz de producir suficientes Ig para combatir infecciones. Adicionado a ello, la estructura de la placenta bovina previene la transferencia de Ig séricas de la madre al feto antes del nacimiento el

cual depende casi totalmente de la transferencia pasiva de Ig maternas presentes en el calostro bovino (Elizondo-Salazar, 2007).

Por mucho tiempo se ha reconocido que para asegurar una adecuada transferencia de inmunidad pasiva en terneras, es necesario la administración de una cantidad correcta de calostro bovino de buena calidad durante las primeras horas de vida; sin embargo, recientemente se ha sugerido que la contaminación bacteriana juega un papel importante (McMartin *et al.*, 2006).

A pesar de sus beneficios nutricionales e inmunológicos, la alimentación con calostro bovino representa la primera oportunidad de exponer al becerro a agentes patógenos infecciosos (Swan *et al.*, 2007). Una mala recolección, manejo y almacenamiento de calostro bovino presenta riesgos de contaminación microbiana (Stewart *et al.*, 2005).

Según Stewart *et al.* (2005) indican que el primer punto de control para alimentar con calostro bovino es prevenir la contaminación durante el ordeño, almacenamiento y proceso de alimentación.

De acuerdo con Gonzalez-Avalos *et al.*, (2012) existen una serie de estrategias para prevenir la proliferación bacteriana en el calostro fresco almacenado como la refrigeración, el congelamiento y el uso de agentes preservantes como el sorbato de potasio (Stewart *et al.*, 2005), un método adicional para reducir o eliminar las bacterias patógenas y cuyo uso se está incrementando es la pasteurización de calostro fresco (McMartin *et al.*, 2006).

La adopción de sistemas de pasteurización a nivel de explotación lechera reporta resultados significativos en la salud de las becerras y en los ingresos económicos del productor (Godden *et al.*, 2006).

Una de las principales preguntas que surgen con respecto a la pasteurización es si dicho procedimiento causa la degradación de las Ig presentes y si resulta en un grado inaceptable de pérdida de anticuerpos en el calostro bovino, creando un alto riesgo de falla

en la transferencia de inmunidad pasiva (FTP) en las terneras, haciendo el procedimiento impráctico de adoptarlo (Godden *et al.*, 2003).

Basado en estudios de Godden *et al.* (2003) el tratamiento térmico por lotes de alta calidad de calostro bovino a 60°C durante 30 minutos se redujo las concentraciones de bacterias y se conservó la concentración de Inmunoglobulina G (IgG) y viscosidad. La eficiencia aparente de absorción de IgG fue mayor para los terneros alimentados con calostro bovino pasteurizado (contra el calostro bovino sin pasteurizar). Las concentraciones de IgG en suero fueron mayores para los terneros alimentados con calostro bovino pasteurizado y no mostró efectos negativos sobre los parámetros de salud y crecimiento.

Las terneras que nacen en cualquier explotación lechera, representan una oportunidad para incrementar el tamaño del hato, para mejorarlo genéticamente y para aumentar el ingreso económico de los productores (Elizondo-Salazar, 2013). La poca atención que se dedica al manejo y nutrición de las terneras, se refleja en una serie de problemas que pasan desapercibidos hasta que la vaca comienza a producir leche e incluso, la mayoría de productores no establecen una relación entre lo que pasó en la época de crianza con el desempeño productivo y reproductivo del animal adulto (Martínez, 2003; Elizondo Salazar, 2013).

En el estado de Jalisco, la producción de bovinos de leche es un pilar importante de la economía nacional al producir por día más de 6 millones de litros de leche (SIAP, 2013), razón por la cual, en las unidades de producción la actividad de recría debe verse fortalecida en todos los aspectos para asegurar obtener ganado de buena calidad que asegure la producción (García, 2007).

García (2007) menciona que pese a las ventajas que representa la crianza de becerras de reemplazo dentro del mismo hato, la actividad de recría no se desarrolla adecuadamente por los productores; ya que según datos de la Secretaria de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (SAGARPA), indican que en México solo el 60% de las explotaciones de ganado lechero Holstein se lleva a cabo la mencionada actividad (SAGARPA, 2002).

El hecho de que no se tenga inclinación a realizar la actividad de recría es atribuible a la frecuente morbilidad y mortalidad de las becerras durante los primeros días de vida a causa de enfermedades digestivas y respiratorias principalmente (Pijoan, 1997).

La actividad de producción de reemplazos, implica un manejo eficiente, técnico y científico de las crías por parte de un operario responsable, consiente de la importancia de extremar medidas de higiene locales para la recría y con las becerras mismas (Pijoan, 1997).

La importancia sanitaria de la pasteurización de calostro bovino de acuerdo a varios estudios, radica en que las poblaciones bacterianas se podrían reducir drásticamente sin afectar a los niveles de IgG y de la viscosidad por calentamiento a una temperatura más baja que la usada para la pasteurización de la leche (Godden *et al.*, 2006; Johnson *et al.*, 2007; Elizondo-Salazar y Heinrichs, 2008).

El fracaso de la transferencia de inmunidad pasiva (FTP) en terneros de reemplazo, se ha relacionado con el aumento de la morbilidad y mortalidad neonatal, disminución a largo plazo en la productividad (Beam *et al.*, 2009). Por esta razón, es necesario realizar más estudios para aclarar los mecanismos precisos detrás del aumento de la absorción de IgG. Así mismo para investigar si la alimentación de calostro bovino pasteurizado tendría un efecto similar en la concentración y en la absorción de Ig (Godden *et al.*, 2003).

2. HIPÓTESIS

La pasteurización de calostro bovino mejora las propiedades sanitarias pero no influye sobre las propiedades fisicoquímicas e inmunológicas.

3. OBJETIVOS

3.1. OBJETIVO GENERAL

Evaluar el efecto de la pasteurización sobre algunas propiedades fisicoquímicas, sanitarias e inmunológicas del calostro bovino.

3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

3.2.1. Evaluar las propiedades fisicoquímicas con base en la determinación de la densidad, proteína (PT) y grasa.

3.2.2. Evaluar las propiedades sanitarias con base en la cuenta total de BMA, cuenta de microorganismos coliformes totales en placa (CTP) e identificación de género y especie de bacterias.

3.2.3. Evaluar los cambios en los contenidos de IgG en calostro bovino debido a la pasteurización y la concentración de ésta en suero sanguíneo.

3.2.4. Evaluar los indicadores de salud de mortalidad, morbilidad y ganancia de peso diaria (GPD) de becerras durante el periodo de lactancia.

4. REVISIÓN DE LA LITERATURA

4.1. TRANSFERENCIA DE INMUNIDAD PASIVA MADRE- TERNERO

El traspaso de inmunidad se le denomina pasivo, debido a que las hembras bovinas por naturaleza son incapaces de entregar Ig al feto durante la preñez, esto debido a su placentación sindesmocorial (Figura 1), el cual genera una barrera entre madre y feto para cierto tipo de macromoléculas, las que no son receptadas en el suministro sanguíneo del ternero, generando entonces al nacimiento un ternero sin defensa contra patógenos (agamaglobulinémico) (Weaver *et al.*, 2000), por lo que su inmunidad tiene que ser proveída a través del calostro.

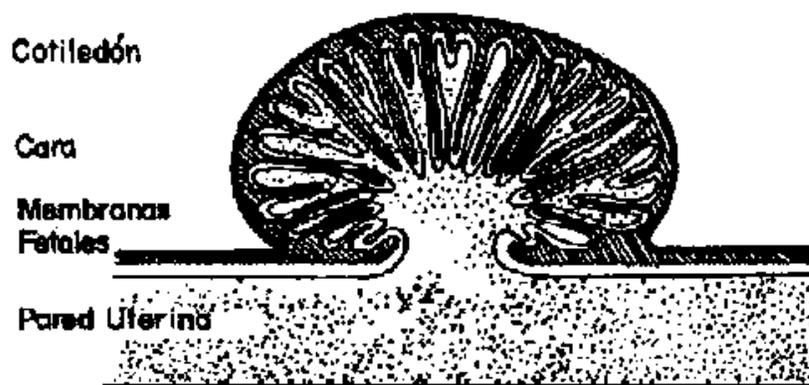


Figura 1 Placentoma de bovino.

Fuente: http://sian.inia.gob.ve/repositorio/revistas_tec/FonaiapDivulga/fd43/texto/retencion.htm

La inmunoglobulina del calostro se une a un receptor Fc especializado en las células epiteliales del intestino de los neonatos llamado FcRn. Este receptor es una molécula MHC clase Id que contiene una cadena alfa grande y una microglobulina $\beta 2$. Es probable que el FcRn se encuentre en todos los mamíferos. Una vez que se unen a FcRn, las inmunoglobulinas son pinocitadas activamente por células epiteliales y pasan a los vasos quilíferos, y tal vez a los capilares intestinales (Figura 2). Al final, las inmunoglobulinas absorbidas llegan a a circulación sistémica, y los neonatos obtienen una transfusión masiva de inmunoglobulina materna (Tizard, 2000).

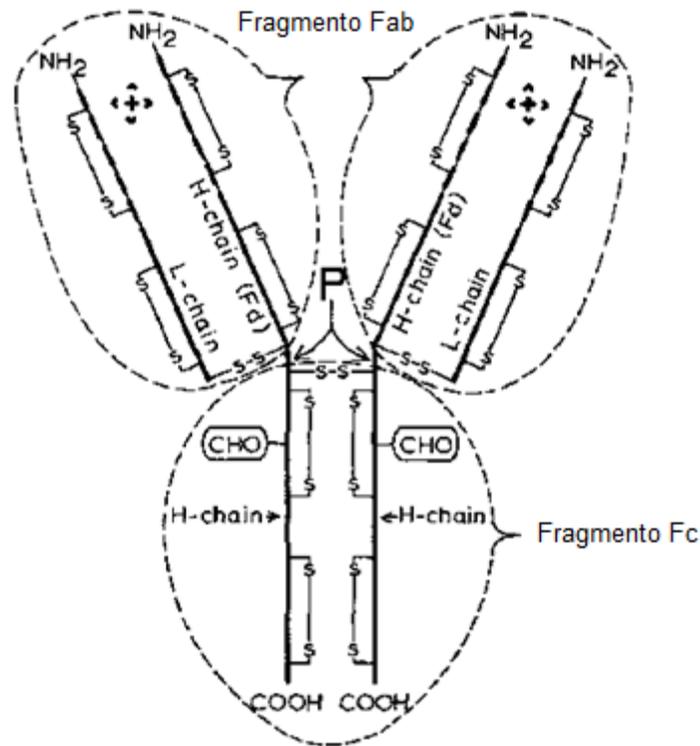


Figura 2 Estructura química de la IgG.
Fuente: Butler (1969).

La absorción de Ig es a través de macromoléculas que viajan por un medio de transporte transitorio, el cual no es selectivo en el epitelio de la pared del intestino (Elizondo-Salazar, 2007).

Las Ig entran a las células y a la linfa intestinal al conducto torácico para posteriormente avanzar por el torrente sanguíneo (Elizondo-Salazar, 2007). Las Ig son transportadas a través de las células y en los vasos linfáticos por exocitosis (Staley *et al.*, 1972).

El mecanismo de cierre del paso de macromoléculas después de las 24 h de nacido aún no está dilucidado por completo, pero lo más probable es a que se deba a la combinación del agotamiento de la capacidad pinocitocis y el reemplazo las enterotocitos por las células epiteliales maduras del intestino delgado (Thompson y Pauli, 1981).

En condiciones normales las concentraciones séricas máximas de inmunoglobulina se alcanzan entre 12 y 24 horas después del nacimiento, los enterocitos absorben los

anticuerpos por 6 h aproximadamente, después de este tiempo, su capacidad de absorción disminuye y es nula a las 24 h de vida (Tizard, 2000) (Cuadro 1).

Cuadro 1. Porcentaje de absorción de Inmunoglobulinas según la edad del ternero.
Fuente: Owen (1996)

Edad del ternero (h)	Absorción de Inmunoglobulinas (%)
0	20
3	15
6	10
12	5
24	0

Cuando cesa la absorción, estos anticuerpos adquiridos de manera pasiva, disminuyen por los procesos catabólicos normales. La rapidez del declive difiere entre las clases de inmunoglobulinas, y el tiempo necesario para llegar a cifras no protectoras depende de su concentración inicial (Tizard, 2000).

Tras la concentración pico de anticuerpos, hay una disminución gradual en el contenido de IgG en suero debido a la interrupción de la absorción y, posiblemente, al catabolismo reflejado en el contenido de Ig en suero y/o transferencia a otros componentes metabólicos, por lo que el pico bastante evidente (Sott *et al.*, 1979) (Figura 3).

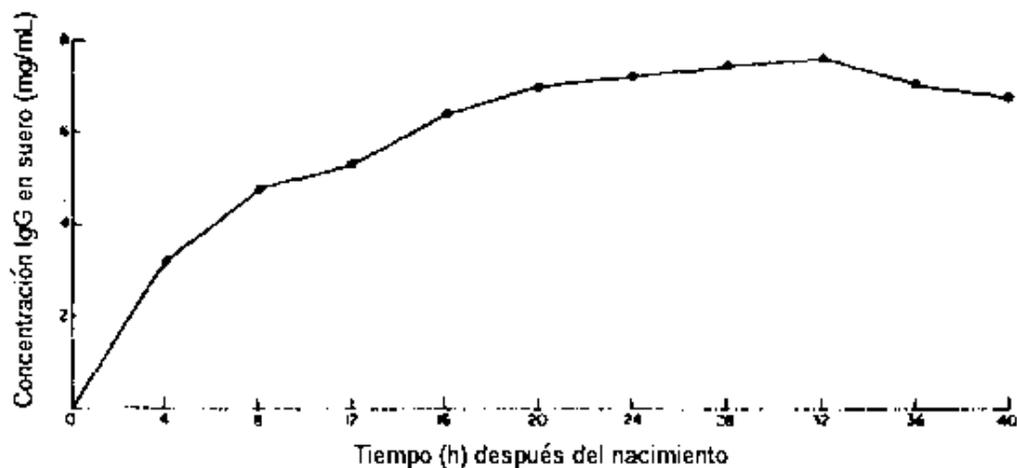


Figura 3 Patrón de concentración de inmunoglobulina G en suero en los terneros que muestran concentraciones crecientes después de la alimentación del calostro.
Fuente: Stott *et al.*, (1979)

Se ha señalado que el calostro bovino produce un recubrimiento con LF 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).

4.1.1. Falla en la transferencia de inmunidad pasiva (FTP).

Los terneros que reciben cantidades inadecuadas de calostro se dice que experimentan una FTP. Ésto se evalúa mediante la medición de la proteína total (PT) o los niveles de IgG en la sangre. Los valores de > 50 g/L PT o > 10 g/L de IgG, generalmente se han definido como los puntos de corte para el éxito de la transferencia pasiva (Weaver *et al.*, 2000; Calloway *et al.*, 2002; Trotz- Williams *et al.*, 2008; Elizondo-Salazar y Heinrichs, 2009 y Godden *et al.*, 2009).

FTP no es una enfermedad, sino una condición que predispone al recién nacido al desarrollo de enfermedades y generar una causal de muerte por patógenos que lo ataquen (Weaver *et al.*, 2000).

Con base en investigaciones previas, hay cuatro factores clave que contribuyen a la exitosa transferencia pasiva de la inmunidad: la alimentación con calostro bovino con una alta concentración de inmunoglobulinas (>50 mg/mL de IgG), que representan un volumen adecuado en el calostro bovino (Figura 4), la alimentación con calostro bovino inmediatamente después del nacimiento, y minimizar la contaminación bacteriana del calostro bovino (Weaver *et al.*, 2000; Johnson *et al.*, 2007; Godden, 2008; Godden *et al.*, 2009).

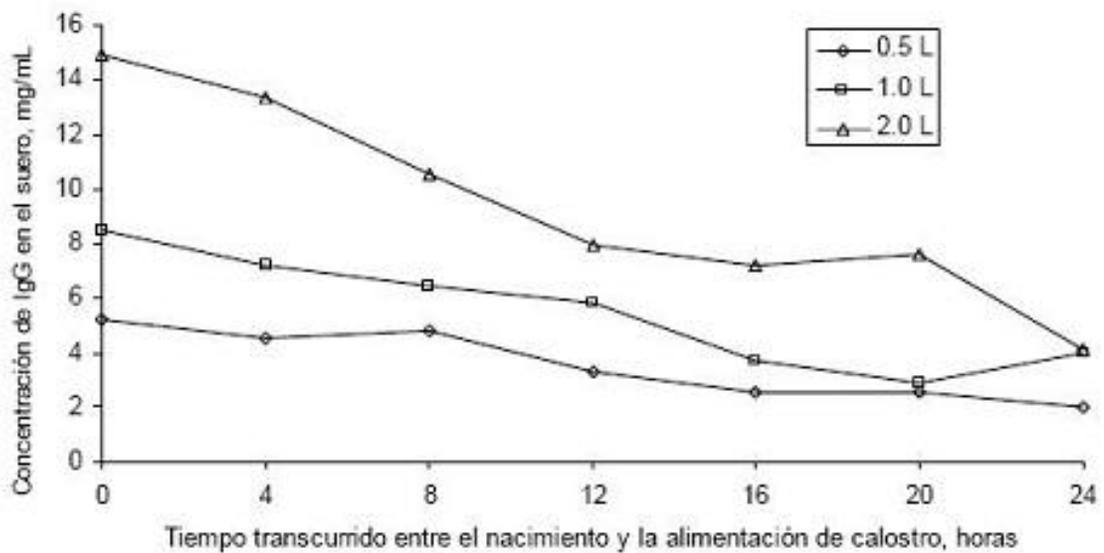


Figura 4 Concentración de IgG en el suero sanguíneo de terneras alimentadas con tres cantidades diferentes de calostro.
Fuente: Stott et al., (1979)

Adecuadas concentraciones séricas de Igs entre las 24 y 48 horas de vida se han asociado con una disminución en la morbilidad y mortalidad en el periodo predestete, mejora en la ganancia de peso, edad reducida al primer parto y mayor producción de leche en la etapa de lactancia (Weaver *et al.*, 2000; Faber *et al.*, 2005; Elizondo-Salazar, 2014).

Adicionalmente, las crías con FTP y niveles bajos de IgG, tienen impactos a largo plazo sobre la productividad, asociada con una disminución de producción de leche durante primera y segunda lactación, así como una mayor tasa de desecho durante la primera lactancia (Faber *et al.*, 2005).

Las estimaciones de la incidencia de FTP en dos programas de evaluación a gran escala de las industrias lácteas estadounidenses oscilaron entre el 40% (Wells *et al.*, 1996) a 19%, más recientemente (Beam *et al.*, 2009).

4.2. CARACTERÍSTICAS GENERALES DEL CALOSTRO

La primera leche secretada por la glándula mamaria después del parto, se considera calostro bovino, siendo la primera fuente de nutrientes para la ternera después del nacimiento y además una fuente importante de inmunoglobulinas (Ig) o anticuerpos, cuya

absorción es esencial para proteger a las becerras contra infecciones entéricas, las cuáles son la razón principal de mortalidad durante las primeras semanas de vida (Elizondo-Salazar, 2007; Wells *et al.*, 1996).

Durante las primeras 24 h de parida, la vaca produce calostro, que después se considera leche de transición, debido a que pierde sus cualidades naturales para convertirse en leche (Plaza *et al.*, 2009).

El calostro bovino no sólo proporciona inmunidad pasiva para el ternero recién nacido, sino también puede tener profundos efectos sobre el desarrollo neonatal del intestino, ya que contiene varios componentes bioactivos y sustancias promotoras del crecimiento como las hormonas peptídicas, de crecimiento, citoquinas, factores de hormonas esteroides, tiroxina, nucleótidos, poliaminas y enzimas (Elizondo-Salazar y Heinrichs, 2009).

A pesar de sus importantes beneficios nutricionales e inmunológicos, el calostro bovino también puede provocar en el becerro una primera exposición a agentes patógenos infecciosos (Swan *et al.*, 2007), debido a la recolección, manejo y almacenamiento de calostro bovino, que puede representar riesgos de contaminación microbiana (Stewart *et al.*, 2005).

4.3. COMPOSICIÓN DEL CALOSTRO BOVINO

4.3.1. Componentes nutricionales del calostro bovino.

El calostro bovino sobrepasa en términos de calidad nutritiva a la leche, en sólidos totales, PT, Ig, energía y grasas (Cuadro 2).

El ternero recién nacido tiene poca grasa corporal, lo que significa que es altamente dependiente de los lípidos y de la lactosa en el calostro como fuente de energía. Estos son utilizados para mantener su temperatura corporal, especialmente en tiempo frío y también se utiliza para el crecimiento (Patel, *et al.*, 2014). En las primeras horas de vida es posible regular la temperatura hasta en un 15% (Haines y Campos, 2008).

La alimentación con calostro estimula la absorción de glucosa, que a su vez controla los niveles de insulina. La insulina así como la glucosa y la acción del cortisol estimulan la síntesis del factor 1 de insulina como promotor de crecimiento, que desempeña un papel en el desarrollo de la cría (Hammon *et al.*, 2012). El contenido de PT de calostro proporciona los aminoácidos para la síntesis de proteínas (Quigley y Drewry, 1998).

Cuadro 2. Composición nutricional del calostro bovino, leche de transición y leche entera.
Fuente: Wattiaux (2002).

Componentes	Número de ordeños					Leche entera
	1	2	3	4	5	
Sólidos totales (%)	23.90	17.90	14.10	13.90	13.60	12.50
Grasa (%)	6.70	5.40	3.90	3.70	3.50	3.20
PT (%)	14.00	8.40	5.10	4.20	4.10	3.20
Anticuerpos (%)	6.00	4.20	2.40	0.20	0.10	0.09
Lactosa (%)	2.70	3.90	4.40	4.60	4.70	4.90
Minerales (%)	1.11	0.95	0.87	0.82	0.81	0.74
Vitamina A (µg/dL)	295.00	190.00	113.00	-	74.00	34.00

4.3.2. Componentes inmunológicos específicos.

Hay muchos componentes beneficiosos que se encuentran en el calostro, además de Ig, energía y proteína. Estos incluyen proteínas bioactivas, oligosacáridos, lípidos, minerales y vitaminas (Wheeler *et al.*, 2012).

En primer lugar el calostro suministra las vitaminas A, D y E de las cuales ninguna atraviesa la placenta en cantidades significativas (Blum y Baumrucker 2002). Estos, junto con otras proteínas como la lactoferrina (LF) estimulan la proliferación de células epiteliales en el intestino delgado en terneros neonatos (Schottstedt *et al.*, 2005).

En segundo lugar, el calostro contiene una serie de sustancias antimicrobianas, incluyendo la LF, LP y lisozima, las cuales pueden suprimir el crecimiento de ciertas bacterias. También hay una serie de otros péptidos antimicrobianos presentes incluyendo α -defensinas, complemento, catelicidina y calgranulinas. En conjunto, éstos pueden

contribuir con el sistema de defensa inmune local de la mucosa intestinal y ayudar con el reconocimiento de patógenos (Wheeler *et al.*, 2012).

Durante los últimos días de gestación, grandes cantidades de Igs son transferidas de la glándula mamaria al calostro (Larson *et al.*, 1980). Sin embargo, muchos factores pueden influir sobre la concentración de Igs en el calostro de vacas lecheras, entre ellos están la raza, el número de parto, la vacunación y el largo del periodo seco (Weaver *et al.*, 2000; Baumrucker *et al.*, 2010; Morril *et al.*, 2012a, Elizondo-Salazar, 2013).

En las horas que preceden y que siguen al parto hay una verdadera trasudación de proteínas séricas, en particular de Ig (lg) que formarán parte del calostro bovino. Su importancia ha sido demostrada en la prevención de la diarrea neonatal, septicemias y afecciones respiratorias de diversa etiología (Cuadro 2).

Cuadro 3. Composición de las inmunoglobulinas presentes en el calostro bovino y leche de bovino.
Fuente: Butler (1969).

Inmunoglobulina	Calostro (mg/mL)	Leche (mg/mL)	Calostro (%)	Leche (%)
IgG ₁	47.60	0.59	81	73
IgG ₂	2.90	0.02	5	2.5
IgA	3.90	0.14	7	18
IgM	4.20	0.05	7	6.5

Las IgG forman la mayor parte de las Ig calostrales en el bovino. La IgG es más pequeña que las otra Ig, por lo que pueden moverse afuera del torrente sanguíneo y avanzar a otras partes del cuerpo. Su función principal es de identificar y ayudar a destruir los patógenos invasores (Quigley, 2008), previniendo además, su fijación, inhibiendo el metabolismo, aglutinando bacterias, y neutralizando virus y bacterias (Liu *et al.*, 2009).

Las IgM son moléculas largas de Ig que están encargadas de la primera línea de defensa en caso de septicemia, las que permanecen en la sangre protegiendo al ternero de bacterias (Quigley, 2008).

Las IgA protegen la superficie mucosas del intestino impidiendo la adhesión patógenos (Quigley, 2008).

4.3.3. Componentes inmunológicos inespecíficos.

El calostro y sus efectos favorables se han conocido durante siglos, pero sólo en los últimos tiempos se han estudiado los componentes biológicos responsables de sus funciones (Sacerdote *et al.*, 2013).

Las propiedades calostro incluyen efectos sobre la protección y la maduración del tracto gastrointestinal del becerro (Blum y Hammon, 2000; Walker, 2010). Estos múltiples efectos están claramente relacionados con la presencia de una gran variedad de factores activos, incluyendo inmunoglobulinas, micronutrientes (Mastroeni *et al.*, 2006), nucleótidos (Schlimme *et al.*, 2000), oligosacáridos (Gopal y Gill, 2000), citoquinas, factores inmunomoduladores y factores de crecimiento termolábiles (Nojiri *et al.*, 2012; Patki *et al.*, 2012; Sacerdote *et al.*, 2013), el complemento y factores antibacterianos (Korhonen *et al.*, 2000; Hanel *et al.*, 2003).

En animales recién nacidos, el grado de actividad proteolítica en el aparato digestivo es bajo, y lo reducen aún más los inhibidores de tripsina del calostro. Así las proteínas del calostro no se degradan ni se usan como alimento, sino que llegan intactas al intestino delgado (Tizard, 2000).

Las citoquinas son pequeñas proteínas solubles que actúan en una forma autocrina y paracrina mediante la unión a receptores celulares específicos, que opera en un sistema y establece el desarrollo del sistema inmune y su funcionamiento. Hay varios tipos de células pueden producir citoquinas: células de la inmunidad innata y adquirida tales como monocitos, macrófagos y linfocitos T y B, y también células no inmunes, incluyendo fibroblastos y células epiteliales mamarias (Wheeler *et al.*, 2007).

Las citoquinas actúan en concentraciones picomolares, y se están acumulando pruebas de que están presentes en el calostro humano y bovino en cantidades que pueden ejercer efecto *in vivo* sobre el recién nacido (Hawkes *et al.*, 1999). Estas consideraciones han sido confirmados por experimentos que muestran que el calostro de bovino pueden modular la actividad de las células inmunes humanas *in vitro* (Biswas *et al.*, 2007).

Entre las sustancias antibacterianas que utiliza la glándula mamaria como defensa, se incluyen complemento, lisosima, lactoferrina y lactoperoxidasa (Tizard, 2000).

La lactoferrina se considera una proteína antibacteriana que se une al hierro e intensifica la explosión respiratoria de los neutrófilos. Compite con las bacterias por el hierro, de modo que impide que los organismos dispongan de él para su desarrollo e inhibe su crecimiento. (Tizard, 2000). Se ha señalado que lo más relevante del calostro es el recubrimiento con lactoferrina en la pared interna del intestino y establecer la microflora (Plaza *et al.*, 1995).

El sistema LP consta de la proteína lactoperoxidasa, peróxido de hidrogeno y tiocianato, En presencia de peroxidasa de hidrogeno exógena, la lactoperoxidasa puede oxidar los iones de tiocianato hasta productos bacteriostáticos que hacen posible la muerte directa de las células bacterianas y tiene una función bactericida cuando todos los componentes del tracto digestivo están disponibles (Tizard, 2000).

El factor de crecimiento tipo insulina 1 y 2 en el calostro bovino y la leche puede apoyar el crecimiento y desarrollo del tracto gastrointestinal neonatal o mejorar la actividad de la lactasa (Wiley, 2012; Nonnecke *et al.*, 2012).

4.3.4. Microbiología.

La leche es un producto biológico rico en carbohidratos, grasas, proteínas, minerales, vitaminas y otros elementos, y posee un pH cercano a la neutralidad. Por estas cualidades, se constituye en un medio adecuado de cultivo para muchas bacterias contaminantes. A pesar de ser recogida asépticamente y procedente de un animal sano, siempre contiene células provenientes de la sangre y de la glándula mamaria, además de los diversos microorganismos que habitan normalmente en el canal del pezón (Elizondo-Salazar *et al.*, 2008).

En la industria lechera existen un grupo de bacterias indeseables en la leche y sus subproductos, su medición se utiliza como indicador de sanidad en la industria lechera.

Estos grupos son conocidos como coliformes y BMA, y se ha decidido su determinación en el calostro como un parámetro para evaluar la calidad del calostro suministrado (Poulsen, *et al.*, 2002).

El calostro puede representar una de las primeras exposiciones potenciales de las terneras lecheras a agentes infecciosos. Los expertos han recomendado que el calostro fresco para alimentar a las terneras debe contener menos de 100.000 UFC/mL de bacterias totales y menos de 10,000 UFC/mL en el CTP (McGuirk y Collins, 2004).

Desafortunadamente, los estudios han indicado que la media de niveles de contaminación bacteriana es significativamente mayor que este punto de corte para la mayor parte de terneras alimentadas con calostro en las lecherías comerciales. La contaminación microbiana del calostro es una preocupación ya que se cree que las bacterias en el calostro pueden interferir con la absorción pasiva de anticuerpos a través del intestino y en la circulación, reduciendo la transferencia pasiva de inmunidad en la ternera. (Poulsen *et al.*, 2002).

4.4. CONSERVACIÓN DE CALOSTRO BOVINO

Los microorganismos se multiplican rápidamente en el calostro, los CTP aumentan rápidamente durante las primeras 24 h (Stewart *et al.*, 2005).

Es esencial recogerlo higiénicamente y luego administrarlo con prontitud después de la recolección (<1h) o almacenarse adecuadamente dentro 1-2 h. La recolección higiénica puede promoverse mediante la limpieza de los pezones en el ordeño, usando cubos de recolección limpios y mantener cubierto cualquier calostro colectado (Patel *et al.*, 2014).

4.4.1. Refrigeración del calostro bovino.

El calostro bovino se puede refrigerar por un periodo máximo de una semana. Sin embargo, es preferible utilizarlo antes de 48 h. La temperatura del refrigerador tiene que ser constante (2- 4°C) (Stewart *et al.*, 2005).

Otro método simple para disminuir la carga microbiana en el calostro es el uso de sorbato de potasio al 0.5% junto con la refrigeración a 4 °C. Las pruebas en los Estados Unidos Americanos, mostraron que fue más eficaz para reducir la proliferación bacteriana en el calostro la refrigeración que a temperatura ambiente. El recuento total de placas (CTP) de bacterias en las muestras almacenadas utilizando conservante en refrigeración se redujo en 24 h y se mantuvo baja y constante durante el período de estudio de 96 h. En contraste, el calostro refrigerado sin conservante mostró un aumento constante en CTP durante el período de 96 h, con el recuento más bajo CTP a las 24 h. Por lo tanto, el calostro refrigerado sin conservante se debe utilizar dentro de 24 h (Stewart *et al.*, 2005).

4.4.2. Congelación del calostro bovino.

Si el calostro se congela, entonces debe hacerse en las cantidades requeridas para el consumo, es decir, en bolsas con 1 o 2 litros de calostro. Las bolsas tipo “Zip” permiten que el calostro sea almacenado lo más plano posible. Esto es importante cuando se presenta el proceso de descongelación, como una bolsa delgada, se descongela mucho más rápidamente que un bloque. El calostro se puede almacenar a -18 a -20 °C hasta 1 año. Debe estar etiquetado con la identificación de la vaca y la fecha de colección y si hay alguna identificación de detección de alguna bacteria (Patel, *et al.*, 2004).

El calostro debe ser descongelado en un baño de agua limpia a una temperatura máxima de 50 °C reemplazando el agua cada 10 minutos hasta que el calostro haya alcanzado una temperatura de 40-42 °C (Mella, 2003).

4.4.3. Pasteurización de calostro bovino.

La pasteurización es el tratamiento térmico al que se somete la leche, consistente en una relación de temperatura y tiempo que garantice la destrucción de microorganismos patógenos y la inactivación de algunas enzimas (NOM-155-SCFI-2012).

A diferencia de la esterilización, la pasteurización no tiene como objetivo eliminar todos los microorganismos. En lugar de ello, la pasteurización tiene como objetivo lograr una reducción en el número de organismos patógenos que puedan causar una enfermedad a las crías (Jay, 2000).

De acuerdo a la NOM-243-SSA1-2010 existen básicamente dos tipos de pasteurización para la leche:

Lenta: 63°C/30 minutos

Rápida 72°C/15 segundos.

La pasteurización de calostro bovino fresco es un método adicional para reducir o eliminar los patógenos bacterianos y cuyo uso se está incrementando (McMartin *et al.*, 2006; González-Ávalos *et al.*, 2013).

Los primeros estudios sobre la pasteurización de calostro se hicieron utilizando los mismos métodos convencionales y las altas temperaturas que se suelen utilizar para pasteurizar la leche (63 °C durante 30 minutos o 72 °C durante 15 segundos). Sin embargo, esto dio resultados inaceptables, incluyendo engrosamiento o congelación de calostro y una desnaturalización de aproximadamente 1/3 de Ig en el calostro (Godden *et al.*, 2003; González-Ávalos *et al.*, 2013).

Pasteurizar el calostro reduce la carga bacteriana y ha demostrado reducir o eliminar ciertos patógenos (*Mycobacterium bovis*, *Escherichia coli*, *Salmonella enteritidis*) que potencialmente pueden causar enfermedades en terneros jóvenes (Godden *et al.*, 2006; Stabel *et al.*, 2004). El calostro pasteurizado se puede dar a la cría directamente o congelarse. La principal preocupación de la pasteurización es la reducción de Ig que puede ocurrir (Patel *et al.*, 2014).

Pasteurizar un lote con un gran volumen de calostro (por ejemplo, 95 L) tarda demasiado tiempo para adquirir la temperatura requerida, lo cual provoca una reducción importante a la concentración de IgG. (Godden *et al.*, 2003). Un volumen de 57 L parece ser el volumen máximo para pasteurizar por lotes, idealmente deben pasteurizarse en lotes de 8-16 L lo que garantiza la mayor cantidad de IgG a la cría (Godden *et al.*, 2003, Johnson *et al.*, 2007).

La IgG1 de calostro bovino tiene una estructura terciaria altamente refinada que confiere a la misma la capacidad para unirse selectivamente al sitio antigénico sobre el agente

patógeno contra el que se dirige y esta estructura se debe mantener para preservar la actividad biológica de la molécula. La IgG1 se desnaturaliza rápidamente a temperaturas superiores a 75°C (Copestake, 2006; Indyk *et al.*, 2006).

Li *et al.* (2005) demostraron una disminución en la actividad inmunológica de IgG bovina con cambios en su estructura secundaria. Indicaron que 72°C es el punto de temperatura crítica para las moléculas de IgG para cambiar su estructura secundaria, lo que coincide con Li-Chan *et al.* (1995), quien informó de que 73°C es la temperatura crítica para IgG bovina a perder su actividad inmunológica.

Varios estudios han sido publicados sobre los efectos del tratamiento térmico de calostro bovino en la desnaturalización de los anticuerpos y la viscosidad; Meylan *et al.* (1996) indicaron una pérdida de 12.3% de IgG después de la pasteurización de 5 mL de calostro bovino a 63°C durante 30 minutos. Godden *et al.* (2003) investigaron el efecto de pasteurización (63°C durante 30 min) en concentraciones de IgG y el fluido y la alimentación de las características de calostro bovino, es decir, una consistencia adecuada para que pueda ser fácilmente alimenta a los terneros usando ya sea botella o sonda esofágica.

Cuando la IgG se somete a tratamiento térmico, el sitio de unión al antígeno en el fragmento Fab se desnaturaliza (Vermeer y Norde, 2000; Cao *et al.*, 2007). Esto está de acuerdo con Domínguez *et al.*, (1997), que indica que las alteraciones estructurales con el calor, en la IgG se encuentran principalmente en los fragmentos Fab, donde se encuentra el sitio de unión al antígeno, en lugar del fragmento Fc.

Domínguez *et al.* (1997) mostraron la capacidad de la IgG para unirse a un antígeno, y por lo tanto para mantener su actividad inmunológica que se mantuvo después de un tratamiento térmico de 63 a 65°C durante 60 minutos. Esto coincide con los resultados de Li-Chan *et al.* (1995) quienes encontraron que el calentamiento de IgG a los $62 \pm 7^\circ\text{C}$ durante 30 minutos no tuvo ningún efecto sobre su actividad de unión contra lipopolisacáridos bacterianos.

Los resultados de este estudio sugieren que la pasteurización de calostro bovino a 60°C durante 30_min, sería una buena alternativa como relación temperatura vs tiempo óptimo, en el que la pasteurización no produciría cambios significativos en sus propiedades fisicoquímicas, una pequeña reducción en sus propiedades inmunológicas, una reducción significativa en el recuento de bacterias y una mejora importante en los parámetros sanitarios en los reemplazos.

Hay evidencia de que el uso del calostro pasteurizado mejora la transferencia pasiva. Elizondo- Salazar y Heinrichs (2009) dieron calostro sin tratamiento térmico con la misma masa de proteínas y 254 g de IgG. Ninguno de ellos experimentó FTP, pero los terneros alimentados con calostro tratado térmicamente tuvo casi el 20% mayor concentración de IgG totales (23.4 frente a 19.6 g/L a las 24 h, y el 23.9 vs. 20.2 g/L a 48 h, respectivamente).

En el mismo estudio se midió la eficacia aparente de la absorción de Ig, resultando mayor para los terneros alimentados con calostro con tratamiento térmico. La absorción de IgG1 de 4 a 48 h de edad varió de 16.1 a 28.4% para los terneros alimentados con calostro sin calefacción y de 19.2 a 33.4% para los terneros alimentados con calostro a tratamiento térmico.

Varias teorías posibles podrían explicar la mejor absorción después del tratamiento térmico. Los anticuerpos en el calostro pueden unirse a patógenos presentes en el intestino antes de que ocurra absorción (Acres, 1985, Saif y Smith 1985).

Por lo tanto, al reducir el número de patógenos en el calostro, el número de patógenos que alcanzan el intestino también se reduce y más anticuerpos son potencialmente libres para la absorción. Además, las bacterias pueden unirse a los receptores no específicos en los enterocitos neonatales, y así reducir el número de receptores disponibles para la absorción de IgG (James *et al.*, 1981).

4.4.4. Liofilizado.

Por medio de este proceso el calostro es sometido a deshidratación en sistemas de vacío donde se adquiere una textura fina del producto en la cual no se altera la composición natural del calostro. Este sistema de almacenamiento es costoso y está fuera del alcance de productor convencional, normalmente se emplea para la producción industrial de calostro. (Campos *et al.*, 2007).

4.5. DETERMINACIÓN DE LA CALIDAD DEL CALOSTRO

Fleenor y Stott (1980) desarrollaron inicialmente una ecuación de regresión para estimar la concentración de Ig en el calostro a partir de la gravedad específica del calostro fresco: $Y = 254.716 X - 261.451$ ($r = 0.84$) (donde Y es la concentración de Ig (%) y X la gravedad específica). Dichos autores desarrollaron un calostrómetro, el cuál incorpora la relación entre la gravedad específica del calostro y la concentración de Ig (mg/mL).

El calostrómetro está calibrado en intervalos de 5 mg/mL y clasifica al calostro en: pobre (rojo). Para concentraciones menores a 22 mg/mL, moderado (Amarillo) para concentraciones entre 22 y 50 mg/mL; y excelente (verde) para concentraciones mayores a 50 mg/mL (Elizondo-Salazar, 2007). El uso del calostrómetro, aunque no provee una medida exacta, permite estimar la calidad de calostro antes de ser alimentado a las terneras, y evitar así, un fracaso en la transferencia de la inmunidad pasiva por el uso de un calostro de baja calidad (Elizondo-Salazar, 2007).

Un aspecto importante es que la lectura del calostrómetro depende altamente de la temperatura del calostro. Mechor *et al.* (1991) llevaron a cabo un estudio cuyo objetivo fue investigar el efecto de la temperatura en lecturas de calostrómetro para estimar la concentración de Ig en el calostro bovino. Dicho estudio determinó que las lecturas difirieron en 0.8 mg/mL por cada grado centígrado en el cambio de la temperatura, por lo que la lectura debe hacerse cuando el calostro se encuentra a temperatura ambiente (20-25°C) (Elizondo-Salazar, 2007).

Refractómetros, tanto ópticos o digitales, se pueden utilizar para estimar la concentración de IgG en el calostro bovino (Bielmann *et al.*, 2010; Morrill *et al.*, 2012a; Quigley *et al.*, 2013; Morrill *et al.*, 2014) y están ganando popularidad en campo. La proteína refracta la luz, y los refractómetros utilizan esta propiedad para estimar la proteína total en una solución (Chavatte *et al.*, 1998).

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1. ÁREA DE ESTUDIO

El primer periodo del experimento se realizó en los meses de febrero a octubre del año 2014 y el segundo periodo se realizó en los meses de febrero a abril del 2015.

El trabajo de campo, se hizo en un establo lechero del tipo tecnificado con ganado especializado de la raza Holstein, dedicada a la venta de leche cruda. Se encuentra ubicado en el municipio de Lagos de Moreno, en el estado de Jalisco, México.

El municipio de Lagos de Moreno se localiza en el estado de Jalisco (Figura 5). Geográficamente entre las coordenadas 21° 12' 00" al 21° 55' 00" de latitud norte y de los 101° 32' 30" a los 102° 10' 30" de longitud oeste, con alturas entre 1,900 a 2,500 metros sobre el nivel del mar.



Figura 5 Ubicación geográfica del Municipio de Lagos de Moreno, Jalisco.
Fuente: Gobierno del estado de Jalisco.

5.2. METODOLOGÍA DE TRABAJO

El trabajo se efectuó en dos etapas: a nivel de laboratorio y a nivel de campo. Para ambos casos el calostro bovino utilizado para este experimento se obtuvo del primer ordeño post-parto de 100 vacas de la raza Holstein, se realizó una Prueba de California para Mastitis para detectar mastitis subclínica, se midió la calidad con un calostrómetro (Cuadro 4) y se ofreció este calostro bovino a terneras de la raza Holstein recién nacidas.

Cuadro 4. Métodos de selección de calidad de calostro en campo.

Propiedades	Determinación.	Procedimiento.	Método de referencia
Selección en campo	Conteo de Células Somáticas	Prueba de California	(González, 1996)
	Concentración de Ig	Calostrómetro	(Fleenor y Stott, 1980)

El primer grupo fue del calostro bovino de 50 vacas el cual no fue sometido a proceso de pasteurización (Grupo A). El calostro bovino de las restantes 50 vacas se pasteurizó a 60°C durante 60 minutos (Grupo B) (Figura 6). Posteriormente, el calostro bovino se conservó en congelación a -20°C en un banco de calostro bovino, período en el cual se realizaron las pruebas de laboratorio.

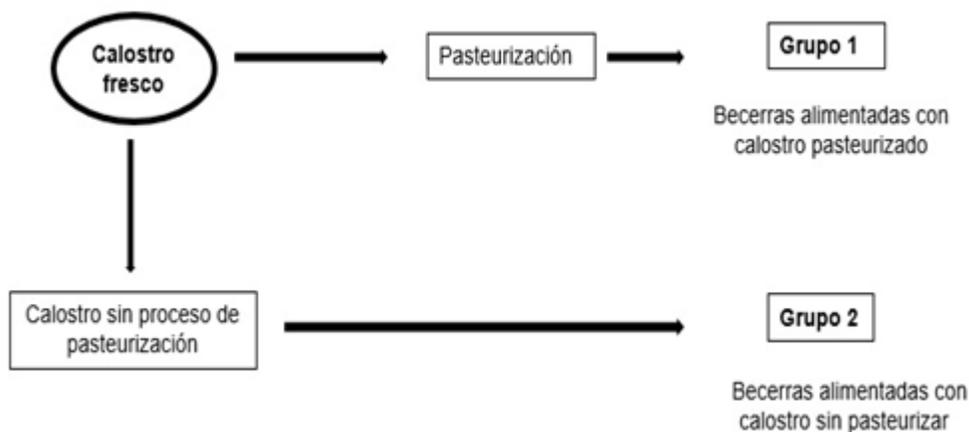


Figura 6 Esquema de identificación de grupos.

Para ser utilizado, el calostro se descongeló por inmersión en agua a una temperatura no mayor de 50°C (Mella, 2003). Al momento del nacimiento, a las crías se les trasladó al área de crianza y el calostro se les administró a las becerros indistintamente.

Para la primera toma, cada becerro recibió 4 litros de calostro bovino de primera ordeña, que se dio inmediatamente después del parto; para la segunda toma, se le proporcionó 2 litros de calostro bovino de primera ordeña y los siguientes dos días se le ofreció leche de transición a razón de 2 litros cada 12 h. Durante estos tres días, la becerro consumió el calostro bovino de la primera ordeña y a continuación, los correspondientes a las ordeñas 2 al 5 (leche de transición) pasteurizado.

Posteriormente, fueron alimentadas hasta los 60 días con sustituto de leche en polvo para becerros (20% de grasa y 18% de proteína), concentrado iniciador *ad libitum*, y agua limpia y fresca.

5.3. DETERMINACIÓN DE PROPIEDADES FISICOQUÍMICAS, SANITARIAS E INMUNOLÓGICAS

A todas las muestras de calostro bovino se le realizaron las siguientes determinaciones, utilizando los siguientes métodos de prueba (Cuadro 5):

Cuadro 5. *Métodos de determinación de propiedades fisicoquímicas, sanitarias e inmunológicas en calostro bovino.*

Propiedades	Determinación.	Procedimiento.	Método de referencia
Fisicoquímicas	Densidad	Refractómetro BRIX	(Quigley <i>et al.</i> , 2012)
	Proteína	Método Kjelder	NMX-F-708-COFOCALEC-2004
	Grasa	Método Gerber	NMX-F-708-COFOCALEC-2004
Inmunológicas	Concentración de IgG en calostro	Radioinmunodifusión	(Morrill <i>et al.</i> , 2014)
	Concentración de IgG en suero sanguíneo	Espectrofotometría	(Valdivia, 1994)
Sanitarias	Identificación de género y especie de bacterias.	Pruebas bioquímicas	(McFaddin, 2003)
	Conteo rápido de CTP	Petrifilm®	NMX-F-717-COFOCALEC-2006
	Conteo de BMA	Petrifilm®	NMX-F-717-COFOCALEC-2006

Se utilizó el mismo método de muestreo para todas las muestras de calostro bovino en estudio, de acuerdo a la NMX-F-718-COFOCALEC-2006. No se agregaron sustancias conservadoras.

Las muestras de calostro bovino se tomaron en frascos estériles de capacidad de 200 mL, se etiquetaron identificando: Predio, Fecha, Hora de muestreo, N° vaca y si estaba pasteurizado o no. Las condiciones de conservación, almacenamiento y transporte de las muestras, se realizaron de acuerdo a la NMX-F-718-COFOCALEC-2006.

Las muestras de calostro bovino se trasladaron al Laboratorio de Investigación de la Posta Zootécnica de la Universidad Autónoma de Aguascalientes (UAA) para determinar la identificación de género y especie de bacterias mediante pruebas bioquímicas, se realizaron siembras en medios Trypticasa, Glucosa tripitcaseína y Endo, tanto para las muestras no pasteurizadas y posterior al proceso de pasteurización. Subsiguientemente se siguió el siguiente esquema (Figura 7):

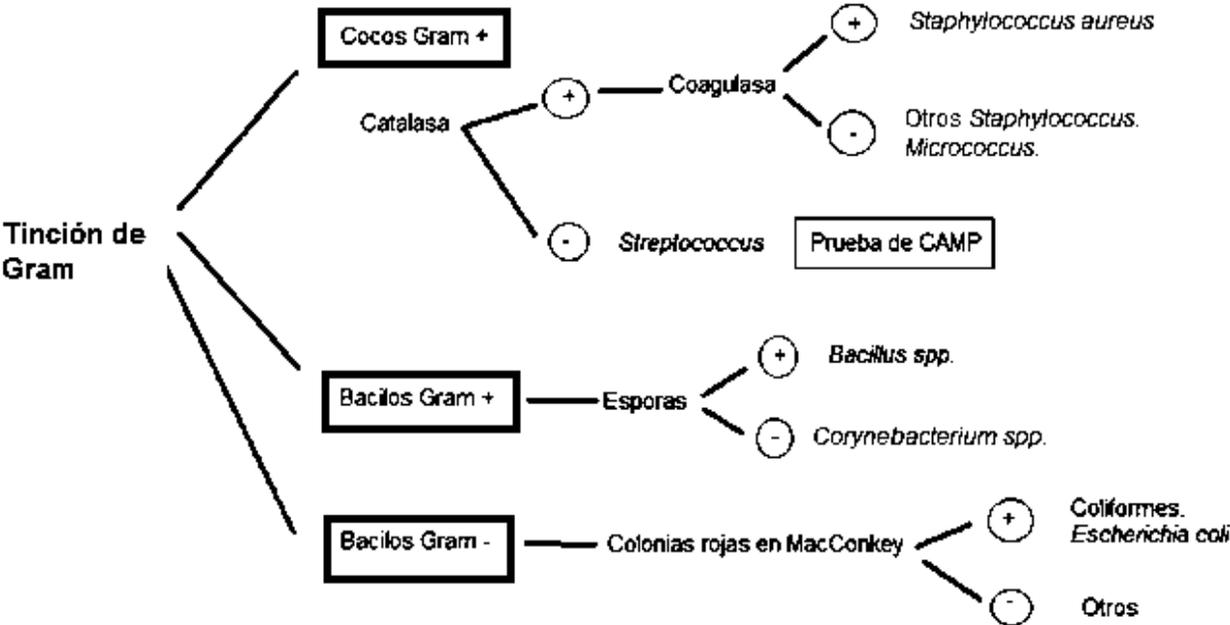


Figura 7 Esquema pruebas bioquímicas.

5.4. IGG EN SUERO SANGUÍNEO

Durante el periodo comprendido del experimento, se visitó el estable en estudio y se tomó una muestra de sangre de cada becerro en estudio de 36 a 48 h de nacidas, por punción en la vena yugular con equipo vacutainer nuevo sin anticoagulante; éstas muestras se tomaron durante el mismo periodo de colección de calostro bovino y se determinó la concentración de Ig en suero sanguíneo mediante refractometría (Quigley, 1999; Morrill, *et al.*, 2015).

Todas las muestras se mantuvieron en congelación a -20°C para su traslado y almacenamiento al Laboratorio de Investigación ubicado en la Posta Zootécnica del Centro de Ciencias Agropecuarias de la Universidad Autónoma de Aguascalientes para ser trabajadas mediante la prueba de turbidez con sulfato de zinc medida en un espectrofotómetro (Figura 8) y evaluada contra una curva patrón de IgG purificada (Pfeiffer. 1977; Valdivia, 1996).



Figura 8 Espectrofotómetro.

5.5. PROCEDIMIENTOS DE PASTEURIZACIÓN

Para este periodo, la pasteurización se llevó a cabo igualmente a nivel de laboratorio y de campo. A nivel de laboratorio el proceso se efectuó en un equipo disponible, que consta

de baño María (Figura 9), seleccionando la temperatura de 60 °C y el tiempo de pasteurización en 60 minutos. Se inoculó una muestra control, con *Brucella abortus* y *E. coli* enterpatogénica y se realizó la siembra en medios de cultivo, antes y después de la pasteurización, para evaluar la eficacia del proceso.

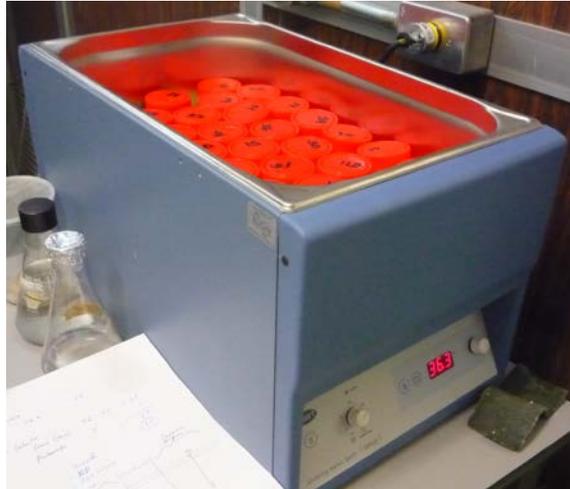


Figura 9 Pasteurización de calostro en laboratorio.

A nivel de campo el proceso de pasteurización del calostro se efectuó en un pasteurizador comercial marca Dairy Tech® (Figura 10), en bolsas “The perfect udder®” también de la marca Dairy Tech® (Figura 11), seleccionando la temperatura de 60 °C y el tiempo de pasteurización en 60 minutos.



Figura 10 Pasteurizador de calostro en campo.



Figura 11. Bolsas utilizadas para la pasteurización de calostro en campo.

Para la realización de los análisis enumerados en el Cuadro 4, el proceso de muestreo en campo, continúa y se toma antes y después de la pasteurización.

5.6. INDICADORES DE SALUD EN LA BECERRA

5.6.1. Ganancia de peso diaria (GPD).

Las becerras fueron pesadas en una báscula inmediatamente al nacer, posteriormente se pesaron al momento del destete y la diferencia de peso fue dividida entre los días de lactancia para calcular la ganancia de peso diaria.

5.6.2. Morbilidad y mortalidad de becerras.

El estado de salud de las terneras fue medido con base en el porcentaje de animales con signos manifiestos de patologías clínicas desde el nacimiento hasta el destete. La evaluación se realizó todos los días y se registró cada caso.

Para definir una patología clínica, se tomó solo los casos que requirieron tratamiento por más de 24 h. La tasa de mortalidad se definió como ternera muerta por causa de alguna enfermedad o muerte por problemas de manejo, medido con base en un porcentaje a partir de las 24 h de nacida durante la lactancia.

5.7. DISEÑO EXPERIMENTAL Y ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Para realizar el análisis de datos se construyó una base de datos con todas las variables dependientes e independientes, mismas que se les asignó una codificación para su correcta inclusión al programa estadístico.

Este análisis se llevó a cabo con el programa estadístico de STATGRAPHICS® Versión 15.2.05 (2007).

Para el análisis de los datos se utilizó el procedimiento de Análisis de Varianza (ANDEVA). Se manejó un modelo estadístico de Diseño Experimental Completamente al Azar (DCA).

$$Y_{ij} = \mu + t_i + e_{ij}$$

Donde Y_{ij} = Corresponde a una observación de la variable Y para el i-ésimo tratamiento y la j-ésima repetición en el i-ésimo tratamiento.

i = Numero de tratamiento.

j = Repetición dentro de tratamiento.

μ = Media general (constante).

t_i = Efecto de los tratamientos.

e_{ij} = Efecto residual o error experimental.

La regla de decisión: Se rechaza la hipótesis nula (H_0) si F calculada (FC) es mayor que F de tablas (Ft). Donde la $H_0: \mu_1 = \mu_2 = \mu_3$; la H_a : al menos un par de medias son diferentes ($\mu_i \neq \mu_j; i \neq j$).

Para la separación de medias, se trabajó con la prueba de Tukey, que es un estadístico utilizado para comparar medias de tratamiento, basado sobre la distribución de rango estudentizado y la distribución normal, con una $p < 0.05$. El estadístico utilizado para obtener los valores críticos de Tukey fue:

$$W = q \cdot (t, gl_E) \cdot (CME)/r$$

En donde w = límite crítico para Tukey.

q_{α} = valor utilizado, generalmente 0.01 y 0.05.

t = número de tratamientos.

gl_E = grados de libertad del error.

• $(CM_E) / r$ = raíz cuadrada del cuadrado medio del error dividida entre el número de repeticiones del tratamiento (r es un valor común).

6. RESULTADOS

6.1. CONTEO DE CÉLULAS SOMÁTICAS

Para el conteo de Células Somáticas, se tomaron muestras de calostro en la primera ordeña y se realizó prueba de California para mastitis (PCM) para determinar la salud de la ubre por cada cuarto y descartar el calostro con presencia de mastitis clínica o sangre. Los resultados que se muestran en el cuadro 6 fueron: para cuartos ciegos y mastitis clínica 0%; para mastitis subclínica grado 2 y 3, de un 3.06% y para grado 1 de 15.3%.

Cuadro 6. Resultados de PCM.

Grado de mastitis	%
Subclínica grado 1	15.30
Subclínica grado 2	3.06
Subclínica grado 3	3.06
Mastitis clínica	0
Cuartos Ciegos	0

6.2. PROPIEDADES FISICOQUÍMICAS DEL CALOSTRO

En el cuadro 7 se muestra diferentes estadísticos de los resultados de la densidad, PT y grasa para cada uno de los 2 tratamientos y la comparación de las medias de los diferentes niveles.

Los promedios de densidad medida en grados BRIX son de 25.63 para calostro no pasteurizado y 26.32 para calostro pasteurizado. Para el caso de PT fueron de 12.84% para calostro no pasteurizado y 12.57% para calostro pasteurizado y en el promedio de grasa 5.96% en calostro no pasteurizado y 5.92 para calostro pasteurizado.

Puesto que el valor-P es mayor o igual que 0.05, no existe una diferencia estadísticamente significativa entre la media de las pruebas para determinar densidad, PT y grasa entre un nivel de tratamiento y otro, con un nivel del 95.0% de confianza.

Cuadro 7. Resumen del análisis estadístico para propiedades fisicoquímicas del calostro.

Determinación	Tratamiento	Media	Error estándar	Valor P
Sólidos totales (%)	NP	25.63	0.42	0.2483
	P	26.32		
Proteína (%)	NP	12.84	0.11	0.0904
	P	12.57		
Grasa (%)	NP	5.96	0.04	0.5101
	P	5.92		

P= Pasteurizado. NP= Fresco.

6.3. PROPIEDADES INMUNOLÓGICAS DE CALOSTRO

En el cuadro 8 se muestra diferentes estadísticos de los resultados de radioinmunodifusión para determinar IgG en calostro y el resultado de espectrofotometría para la determinación de IgG en suero sanguíneo para cada uno de los 2 tratamientos y comparar las medias de los diferentes niveles.

Los promedios de IgG en calostro fueron de 109.0 mg/mL para calostro no pasteurizado y 112.4 mg/mL para calostro pasteurizado. Para el caso de IgG en suero sanguíneo, fueron de 11.09 mg/mL para calostro no pasteurizado y 11.5 mg/mL para calostro pasteurizado

Puesto que el valor P es mayor o igual que 0.05, no existe una diferencia estadísticamente significativa entre las medias de las pruebas para determinar IgG en calostro y suero sanguíneo entre un nivel de tratamiento y otro, con un nivel del 95.0% de confianza.

Cuadro 8. Resumen del análisis estadístico para propiedades inmunológicas del calostro.

Determinación	Tratamiento	Media	Error estándar	Valor P
IgG Calostro (mg/mL)	NP	109.00	1.59	0.1342
	P	112.40		
IgG Suero sanguíneo (mg/mL)	NP	11.09	0.20	0.1527
	P	11.50		

P= Pasteurizado. NP= No pasteurizado.

6.4. PROPIEDADES SANITARIAS DEL CALOSTRO

Tanto en las muestras de calostro no pasteurizado como en las muestras pasteurizadas se identificó la presencia de bacterias mediante pruebas bioquímicas (Cuadro 9) presentando una reducción en el crecimiento bacteriano con el proceso de pasteurización.

Cuadro 9. Resultado de género y especie de pruebas bioquímicas.

	Calostro no pasteurizado	Calostro Pasteurizado
Staphylococcus aureus	0.12%	-
Staphylococcus coagulasa neg.	57.84%	1.96%
Streptococcus spp	8.82%	1.96%
Corynebacterium spp	14.70%	0.98%
CTP	6.86%	-
Brucella abortus	-	-

En el cuadro 10 se muestra diferentes estadísticos de los resultados de las pruebas para la determinación de las propiedades sanitarias del calostro mediante el conteo de BMA y CTP.

Cuadro 10. Resumen del análisis estadístico para propiedades sanitarias del calostro.

Determinación	Tratamiento	Media	Error estándar	Valor P
Mesofílicos aerobios (UFC/mL)	NP	27,781.60	241.39	0.0000
	P	7,469.86		
CTP (UFC/mL)	NP	138.00	1.47	0.0000
	P	0.00		

P= Pasteurizado. NP= No pasteurizado.

Los promedios de BMA para calostro no pasteurizado fueron de 27,781.6 UFC/mL y 7,469.86 UFC/mL para calostro pasteurizado. Para el caso de CTP, fueron de 138 UFC/mL para calostro no pasteurizado y 0 UFC/mL para calostro pasteurizado.

Puesto que el valor P no es mayor o igual que 0.05, existe una diferencia estadísticamente significativa entre las medias de las pruebas para BMA y CTP entre un nivel de tratamiento y otro, con un nivel del 95.0% de confianza.

6.5. PARÁMETROS DE SALUD DE LAS BECERRAS

Se registró el 4% de mortalidad de crías a causa de problemas digestivos en el grupo de animales alimentados con calostro no pasteurizado comparado con la ausencia de crías muertas alimentadas con calostro pasteurizado.

Se registró un 35% de morbilidad de diarrea en el grupo de animales alimentados con calostro no pasteurizado comparado con el 30% de morbilidad de diarrea en crías alimentadas con calostro pasteurizado.

En el cuadro 11 se muestra diferentes estadísticos de los resultados de ganancias de peso en las becerras en lactancia para cada uno de los dos tratamientos y comparar las medias de los diferentes niveles.

Los promedios de ganancia de peso diaria fueron de 0.982 kg/día para el grupo de becerras alimentadas con calostro no pasteurizado y 1.117 kg/día para las becerras alimentadas con calostro pasteurizado. Para el caso de IgG en suero sanguíneo, fueron de 11.09 mg/mL para calostro no pasteurizado y 11.5 mg/mL para calostro pasteurizado.

Cuadro 11. Resumen del análisis estadístico para ganancias de peso diarias en becerras.

Parámetro	Tratamiento	Media	Error estándar	Valor P
Ganancia de peso diaria (kg/día)	NP	0.982	0.0111	0.0000
	P	1.117		

P= Pasteurizado. NP= No pasteurizado.

Puesto que el valor P es menor que 0.05, no existe una diferencia estadísticamente significativa entre las medias de las ganancias de peso diarias entre un nivel de tratamiento y otro, con un nivel del 95.0% de confianza.

7. DISCUSION

Este estudio reporta los efectos del calostro pasteurizado a 60°C durante 60 minutos utilizando un pasteurizador comercial en la explotación lechera, así como los resultados de la transferencia pasiva a las becerras y sus parámetros de salud.

Al igual que en los resultados de Elizondo-Salazar y Heinrichs (2009), se realizó un análisis de la composición del calostro fresco y pasteurizado y a pesar de que se observó que el tratamiento térmico creó algunos cambios en la viscosidad del calostro, la composición estaba de acuerdo con los valores reportados por Foley y Otterby (1978) y Kehoe *et al.* (2007). Elizondo-Salazar y Heinrichs (2009) reportan valores de grasa para calostro fresco de 16.27% y pasteurizado de 16.33%; para PT en calostro fresco fue de 14.20% y pasteurizado de 15.75%. Todos ellos coinciden con los resultados de este estudio.

Investigaciones previas han informado del éxito en la reducción o la eliminación de patógenos, mientras que se preserva tanto la cantidad de anticuerpos protectores y las características de viscosidad cuando el calostro se pasteurizó a 60°C durante 60 minutos (Godden *et al.*, 2006; McMartin *et al.*, 2006). Godden *et al.* (2007) reportaron un cambio significativo en las concentraciones de IgG del calostro, reduciendo significativamente el conteo total de bacterias en placa y CTP.

En este trabajo hubo una reducción significativa en el CTP. La media del conteo de BMA en el calostro pasteurizado de este estudio mostró diferencias estadísticamente significativas, encontrándose por debajo del límite que la industria actual recomienda, siendo inferior de 100,000 UFC/mL para el calostro, similar a lo que reporta el estudio de McGuirk y Collins, 2004.

Aunque los factores inmunitarios del calostro son esenciales para la salud de los terneros, la contaminación bacteriana del calostro puede negar algunos de estos beneficios. Otros estudios de laboratorio han informado del éxito en la reducción o la eliminación de patógenos cuando el calostro pasteurizado (Godden *et al.*, 2006; McMartin *et al.*, 2006;

Trujillo *et al.*, 2007). En el presente estudio no hubo crecimiento de bacterias patógenas en el calostro pasteurizado de las muestras que se inocularon.

Los terneros se definen por tener FTP si la concentración de IgG en suero es <10 g/L cuando se muestrea entre 24 y 48 h de edad (Weaver *et al.*, 2000). Aunque sea adecuada la IgG de suero, esta también depende de la eficacia de la absorción (Morin *et al.*, 1997).

No se encontraron diferencias significativas al comparar las concentraciones séricas de IgG en becerras de 48 h de nacidas a diferencia de Godden *et al.* (2007) que reporta un incremento en la concentración de IgG en suero de terneros alimentados con calostro pasteurizado. Los autores plantearon la hipótesis de que las concentraciones de IgG aumentaron porque los terneros fueron capaces de absorber una mayor proporción de la masa total de IgG presentado al intestino delgado; sin embargo, Patel, *et al.* (2014) mencionan los factores que intervienen en la falla de la transferencia de la inmunidad pasiva como son: calidad y cantidad de calostro, tiempo y método de alimentación, higiene, monitoreo de animales y manejo del sistema.

El porcentaje de morbilidad de la diarrea en este es mayor al 20% con 1,2% de mortalidad a causa de la diarrea reportado por Walker *et al.* (2012). En estudios similares (Virtala *et al.*, 1996) se encuentran resultados a nivel de establo, de morbilidad por diarrea en de un 43% en promedio y la mortalidad por diarrea en promedio de 4.1%.

8. CONCLUSION

Basado en el estudio actual, la pasteurización de calostro bovino a 60 °C durante 60 minutos, no modificó sus propiedades fisicoquímicas e inmunológicas, pero sí mejoró su calidad sanitaria.

Los valores de IgG en calostro luego de la pasteurización no se vieron afectados. Sin embargo, tampoco hubo una diferencia en la concentración de IgG en suero sanguíneo de las becerras. Aunque el mecanismo preciso para la absorción de IgG del calostro es multifactorial, las mejoras en el sistema alimentación permitirían el aumento de las concentraciones de IgG.

Los indicadores de salud (mortalidad, morbilidad y ganancia de peso diaria) de becerras durante el periodo de lactancia, no se vieron influenciadas de manera significativa pues los factores de manejo del sistema fueron un elemento que participan de manera importante en los resultados.

9. LITERATURA CITADA

- Acres, S.D. 1985. Enterotoxigenic *Escherichia coli* infections in newborn calves: a review. *Journal of Dairy Science* 68: 229-256.
- Beam, A.L., Lombard, J.E., Koprak, C.A., Garber, L.P., Winter, A.L., Hicks J.A., Schlater, J.L. 2009. Prevalence of failure of passive transfer of immunity in newborn heifer calves and associated management practices on US dairy operations. *Journal of Dairy Science* 92: 3973-3980.
- Baumrucker, C.R., A.M. Burkett, A.L. Magliaro-Macrina, y C.D. Dechow. 2010. Colostrógenesis: mass transfer of immunoglobulin G1 into colostrum. *Journal of Dairy Science* 93:3031-3038.
- Bielmann, V., J. Gillan, N. R. Perkins, A. L. Skidmore, S. Godden, and K. E. Leslie. 2010. An evaluation of brix refractometry instruments for measurement of colostrum quality in dairy cattle. *Journal of Dairy Science* 93:3713–3721.
- Biswas, P., Vecchi, A., Mantegani, P., Mantelli, B., Fortis, C., y Lazzarin, A. 2007. Immunomodulatory effects of bovine colostrums in human peripheral blood mononuclear cells. *New Microbiologica*. 30: 447–454.
- Butler, J. E. 1969. Bovine immunoglobulins: A review. *Journal of Dairy Science* 52:1895–1909.
- Calloway, C.D., Tyler, J.W., Tessman, R.K., Hostetler, D., Holle, J. 2002. Comparison of refractometers and test endpoints in the measurement of serum protein concentration to assess passive transfer status in calves. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 221: 1605-1608.
- Campos, R., Carrillo, A.F., Loaiza, V., Giraldo, I. 2007. El calostro: herramienta para la cría de terneros. Palmira, Valle del Cauca, Colombia. 12p.
- Cao, J., Wang, X. y Zheng, H. 2007. Comparative studies on thermoresistance of protein G-binding region and antigen determinant region of immunoglobulin G in acidic colostrum whey. *Food and Agriculture Immunology*. 18:17–30.
- Chavatte, P., F. Clement, R. Cash, and J. F. Grognet. 1998. Field determination of colostrum quality by using a novel, practical method. *Proc Annual Convention AAEP*. 44:206–209.

- Copestake, D.E., Indyk, H. E. y Otter, D.E. 2006. Affinity liquid chromatography method for the quantification of immunoglobulin G in bovine colostrum powders. *Journal of AOAC International*. 89, 1249-1256.
- Domínguez, E., Perez, M.D. y Calvo, M. 1997. Effect of heat treatment on the antigen-binding activity of anti-peroxidase immunoglobulins in bovine colostrum. *Journal of Dairy Science*. 80:3182-3187.
- Elizondo-Salazar, J. A. 2007. Alimentación y manejo del calostro en el ganado de leche. *Agronomía mesoamericana* 18(2): 271-281.
- Elizondo-Salazar, J. A. 2013. Requerimientos de energía para beceras de recría. *Agronomía mesoamericana*. 24(1):209-214.
- Elizondo-Salazar, J. A. 2014. Concentración de inmunoglobulinas totales en calostros de vacas en explotaciones lecheras de Costa Rica. *Agronomía Mesoamericana*. 26(1):27-32.
- Elizondo-Salazar, J.A. y Heinrichs A. J. 2008. Heat treating bovine colostrum. *Professional Animal Scientist* 24:530–538.
- Elizondo-Salazar, J.A. y Heinrichs, A. J. 2009. Feeding heat-treated colostrum to neonatal dairy heifers: Effects on growth characteristics and blood parameters. *Journal of Dairy Science*.
- Elizondo-Salazar, J.A., Jayarao, B.M. y Heinrichs, A.J. 2008. Colostrum pasteurization: Effect on bacterial count and immunoglobulin G concentration. *REDVET*. 9: 1695-7504.
- Faber, S. N., Faber, N. E., McCauley, T.C. y Ax, R.L. 2005. Effects of colostrum ingestion on lactational performance. *Professional Animal Scientist* 21:420–425.
- Fleener, W.A.; Stott, G.H. 1980. Hydrometer test for estimation of immunoglobulin concentration in bovine colostrum. *Journal of Dairy Science*. 63:973-977.
- Foley, J.A., Hunter, A.G., Otterby, D.E. 1978. Absorption of colostrum proteins by newborn calves fed unfermented, fermented, or buffered colostrum. *Journal of Dairy Science* 61: 1450-1456.
- García, R.M. 2007. Prevalencia y factores de riesgo asociados a criptosporidiosis en beceras lactantes de tres establos del estado de Aguascalientes. Tesis doctoral. *Universidad de Colima*. México.

- Gobierno del estado de Jalisco, 2014. Disponible en la Web: <http://www.jalisco.gob.mx/es/jalisco/municipios/lagos-de-moreno>
- Godden, S. M. 2008. Colostrum management for dairy calves. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice* 24:19–39.
- Godden, S.M., D.J. Smolenski, M. Donahue, J.M. Oakes, R. Bey, S. Wellsa, S. Sreevatsan, J. Stabel, y J. Fetrow. 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, S.M., Haines, D.M., Konkol, K., 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.
- Godden, S. M., McMartin, S., Feirtag, J., Stabel, J., Bey, R., Goyal, S., Metzger, L., Fetrow J., Wells, S., y Chester-Jones, H. 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, S. M., Smith, S., Feirtag, J.M., Green L.R, Wells, S.J., y Fetrow J.P. 2003. Effect of on farm commercial batch pasteurization of colostrum on colostrum and serum immunoglobulin concentrations in dairy calves. *Journal of Dairy Science*. 86:1503-1512.
- González C. E., 2009. Evaluación del extracto de piel de *Rana catesbeiana*, como tratamiento alternativo en bovinos con mastitis clínica. Tesis de maestría. *Universidad de Guadalajara*. México.
- Gopal, P.K. y Gill, H.S. 2000. Oligosaccharides and glycoconjugates in bovine milk and colostrum. *British Journal of Nutrition*.. 84: S69–S74.
- Haines, D. y Campos, C. 2008. Funciones del calostro en las primeras 24 horas de vida en becerros. Workshop SOCHIPA XXXIII. Universidad Austral de Chile. Valdivia, Chile.
- Hanel, R.M., Crawford, P.C., Hernandez, J., Benson, N.A., y Levy, J.K. Neutrophil function and plasma opsonic capacity in colostrum-fed and colostrum-deprived neonatal kittens. *American Journal of Veterinary Research*. 2003; 64: 538–543.
- Hammon, H.M., Steinhoff-Wagner, J., Schönhusen, U., Metges, C.C., Blum, J.W. 2012. Energy metabolism in the newborn farm animal with emphasis on the calf:

- endocrine changes and responses to milk-borne and systemic hormones. *Domestic Animal Endocrinology* 43: 171-185.
- Hawkes, J.S., Bryan, D.L., James, M.J., y Gibson, R.A. 1999. Cytokines (IL-1², IL-6 TNF[±], TGF² 1 and TGF² 2) and prostaglandin E2 in human milk during the first three months postpartum. *Pediatric Research*. 46: 194–199.
- Indyk, H.E., Edwards, M.J. y Woollard, D.C. 1996. High performance liquid chromatographic analysis of lactose-hydrolysed milk. *Food chemistry*. 57(4):575-580.
- James, R.E., Polan, C.E., Cummins, K.A. 1981. Influence of administered indigenous microorganisms on uptake of [iodine-125] gamma-globulin in vivo by intestinal segments of neonatal calves. *Journal of Dairy Science* 64: 52-61.
- Jay, J.M. 2000. High temperature food preservation and characteristics of thermophilic microorganisms. In: Jay JM editors. *Modern Food Microbiology*. Gaithersburg, MD: Aspen Publisher Inc.; p. 341. Disponible en la web en: http://link.springer.com/chapter/10.1007/978-1-4615-4427-2_17#page-1
- Johnson, J.L., Godden, S.M., Molitor, T., Ames T. y Hagman D. 2007. Effects of feeding heat-treated colostrum on passive transfer of immune and nutritional parameters in neonatal dairy calves. *Journal of Dairy Science*. 90:5189–5198.
- Kehoe, S.I., Jayarao, B.M. y Heinrichs, A.J. 2007. A survey of bovine colostrum composition and colostrum management practices on Pennsylvania dairy farms. *Journal of Dairy Science*. 90:4108–4116.
- Korhonen, H., Marnila, P., y Gill, H.S. 2000. Milk immunoglobulins and complement factors. *British Journal of Nutrition*. 84: S75–S80.
- Larson, B L.; Heary, H.L.; Devery, J.E. 1980. Immunoglobulin production and transport by the mammary gland. *Journal of Dairy Science*. 63:665-671.
- Li, S.Q., Bomser, J.A. y Zhang, H. 2005. Effects of pulsed electric fields and heat treatment on stability and secondary structure of bovine immunoglobulin G. *J. Agricultural and Food Chemistry*. 53:663-670.
- Li-Chan, E., Kummer, A., Losso, J.N., Kitts, D.D. y Nakai, S. 1995. Stability of bovine immunoglobulins to thermal treatment and processing. *Food Research International* 28:9–16.

- Liu, G., Wang, J., Bu, D., Cheng, J., Zhang, C., Wei, H., Zhou, L., Zhou, Z., Hu, H., y Dong, X. 2009. Factors affecting the transfer of immunoglobulin G1 into the milk of Holstein cows. *The veterinary journal*. 182(1): 79-85.
- Martínez, A. 2003. Manual de crianza de becerras. 2 ed. *Grupo Editores Agropecuarios. Estado de México, México*. 144 p.
- Mastroeni, S.S., Okada, I.A., Rondó, P.H., Duran, M.C., Paiva, A.A., y Neto, J.M. 2006. Concentrations of Fe, K, Na, Ca, P, Zn and Mg in maternal colostrum and mature milk. *Journal of Tropical Pediatrics*. 52: 272–275.
- McFaddin, J., F. 2003. Pruebas bioquímicas para la identificación de bacterias de importancia clínica. 3ra. Edición. *Editorial Panamericana*. Argentina.
- McGuirk, S. M. y M. Collins. 2004. Managing the production, storage and delivery of colostrum. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice* 20:593–603.
- McMartin, S., Godden, S., Metzger, L., Feirtag, J., Bey, R., Stabel, J., Goyal, S., Fetrow, J., Wells, S. y 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.
- Mechor, G.D.; Grohn, Y.T.; Van Saun, R.J. 1991. Effect of temperature on colostrometer readings for estimation of immunoglobulin concentration in bovine colostrum. *Journal of Dairy Science*. 74:3940-3943.
- Mella, C. 2003. Factores a considerar para el logro de una adecuada alimentación con calostro. Santiago de Chile. *Universidad de Chile, Facultad de Ciencias Agronómicas, Departamento de Producción Animal*. 29: 6-14.
- Meylan, M., Rings, D.M., Shulaw, W.P., Kowalski, J.J., Bech-Nielsen, S. y Hoffsis, G.F. 1996. Survival of *Mycobacterium paratuberculosis* and preservation of immunoglobulin G in bovine colostrum under experimental conditions simulating pasteurization. *American Journal of Veterinary Research*. 57:1580–1585.
- Morrill, K.M., E. Conrad, A. Lago, J. Campbell, J. Quigley, y H. Tyler. 2012a. Nationwide evaluation of quality and composition of colostrum on dairy farms in the United States. *Journal of Dairy Science*. 95:3977-4005.
- Morrill, K. M., Conrad, E. Polo, J., A. Lago, Campbell, J. Quigley, J. y Tyler H. 2012b. Estimate of colostrum immunoglobulin G concentration using refractometry without or with caprylic acid fractionation. *Journal of Dairy Science*. 95:3987–3996.

- Morrill K. M., Robertson K. E., Spring M. M., Robinson A. L., y Tyler H. D. 2015. Validating a refractometer to evaluate immunoglobulin G concentration in Jersey colostrum and the effect of multiple freeze–thaw cycles on evaluating colostrum quality. *Journal of Dairy Science*. 98:595–601.
- Morin, D. E., G. C. McCoy, y W. L. Hurley. 1996. Effects of quality, quantity, and timing of colostrum feeding and addition of a dried colostrum supplement on immunoglobulin G1 absorption in Holstein bull calves. *Journal of Dairy Science*. 80:747–753.
- Nojiri, T., Yoshizato, T., Fukami, T., Obama, H., Yagi, H., Yotsumoto, F., y Miyamoto, S. 2012. Clinical significance of amphiregulin and epidermal growth factor in colostrum. *Archives of Gynecology and Obstetrics*. 286: 643–647.
- Nonnecke, B.J., W.R. Waters, J.P. Goff, y M.R. Foote. 2012. Adaptive immunity in the colostrum-deprived calf: Response to early vaccination with *Mycobacterium bovis* strain bacile Calmette Guerin and ovalbumin. *Journal of Dairy Science*. 95:221-239.
- NMX-F-717-COFOCALEC-2006. 2006. Sistema producto Leche – Alimentos – Lácteos – Análisis microbiológicos de leche y derivados – Métodos de prueba rápidos.
- NMX-F-718-COFOCALEC-2006. 2006. Sistemas de producto leche-Alimentos-Lácteos-Guía para el muestreo de leche y productos lácteos.
- NOM-155-SCFI-2012. 2012. Leche - Denominaciones, especificaciones fisicoquímicas, información comercial y métodos de prueba.
- NOM-243-SSA1-2010. 2010. Productos y servicios. Leche, fórmula láctea, producto lácteo combinado y derivados lácteos. Disposiciones y especificaciones sanitarias. Métodos de prueba.
- Patel, S., Gibbons, J. y Wathes, D.C. 2014. Ensuring optimal colostrum transfer to newborn dairy calves. *Cattle Practice*, Vol 22, Part 1 (95-104).
- Pfeiffer, N.E., Mc Guirck, T.C., Bendel, R.B. y Weikel, J.M. 1977. Quantation of bovine inmunoglobulins: comparison of single radial inmunodiffusion, zinc sulphate turbidity, serum electrophoresis and refractometer methods. *American Journal of Veterinary Research*. 38(5): 693-8

- Pijoan, A.P. 1997. Factores de manejo asociados con la mortalidad de becerras en establos de Tijuana, Baja California, Mexico. *Veterinaria México*. 28:269-275.
- Plaza, J., Martínez, Y. e Ibalmea, R. 2009. Respuesta del uso eficiente del calostro en los terneros de una lechería. *Revista Cubana de Ciencia Agrícola*. 43(1): 15-18.
- Poulsen, K. P., Hartmann, F.A. y Mcguirk, S. M. 2002. Bacteria in colostrum: impact on calf health. Abstr. 52 in proc. 20th american college of internal veterinary medicine. Dallas, tx. Pp. 773.
- Patki, S., Patki, U., Patil, R., Indumathi, S., Kaingade, P., Bulbule, A., Nikam, A., y Pishte, A. 2012. Comparison of the levels of the growth factors in umbilical cord serum and human milk and its clinical significance. *Cytokine*. 59: 305–308.
- Quigley, J. 1999. #39 - Usando el refractómetro. Disponible en la web: <http://www.calfnotes.com/pdf/CN039e.pdf>
- Quigley, J. 2008. #137 Failure of passive transfer effect of the calf. Disponible en la Web: <http://www.calfnotes.com/pdf/CN137.pdf>
- Quigley, J.D., Drewry, J.J. 1998. Nutrient and immunity transfer from cow to calf pre- and postcalving. *Journal of Dairy Science* 81: 2779-2790.
- Quigley, J. D., Lago, A. C. Chapman, P. Erickson, and J. Polo. 2013. Evaluation of the brix refractometer to estimate immunoglobulin G concentration in bovine colostrum. *Journal of Dairy Science* 96:1148–1155.
- Sacerdote, P. F. Mussano, S. Franchi, A.E. Panerai, G. Bussolati, S. Carossa, A. Bartorelli, B. Bussolati. 2013. Biological components in a standardized derivative of bovine colostrum. *Journal of Dairy Science*. 96(3):1745-1754.
- Saif, L.J., Smith, K.L. 1985. Enteric viral infections of calves and passive immunity. *Journal of Dairy Science* 68: 206-228.
- Schottstedt, T., Muri, C., Morel, C., Philipona, C., Hammon, H.M., Blum, J.W. 2005. Effects of feeding vitamin A and lactoferrin on epithelium of lymphoid tissues of intestine of neonatal calves. *Journal of Dairy Science* 88: 1050-1061.
- Secretaría de Agricultura, Ganadería, desarrollo Rural, Pesca y Alimentación. SAGARPA. 2002. Inventario de ganado productor de leche en la República Mexicana. Datos preliminares. Disponible en la Web: <http://www.sagarpa.gob.mx>
- Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación. SAGARPA. 2013. Avance mensual de la producción pecuaria por estado, Jalisco.

Disponible en la web: <http://www.siap.gob.mx/ganaderia-avance-de-la-produccion-pecuaria-por-estado>.

Schlimme, E., Martin, D., y Meisel, H. 2000. Nucleosides and nucleotides: natural bioactive substances in milk and colostrum. *British Journal of Nutrition*. 84: S59–S68.

Stabel, J.R., Hurd, S., Calvente, L. y Rosenbusch, R.F. 2004. Destruction of *Mycobacterium paratuberculosis*, *Salmonella spp.* and *Mycoplasma spp.* in raw milk by a commercial on-farm high-temperature, short-time pasteurizer. *Journal of Dairy Science*. 87:2177–2183.

Stewart, S., Godden, S.M., Bey, R., Rapnicki, P., Fetrow, J., Farnsworth, R., Scanlon, M., Arnold, Y., Clow, L., Mueller, K. y Ferrouillet, C. 2005. Preventing bacterial contamination and proliferation during the harvest, storage and feeding of fresh bovine colostrum. *Journal of Dairy Science*. 88:2571-2578.

Stott, G.H.; Marx, D.B.; Menefee, B.E.; Nightengale, G.T. 1979. Colostral immunoglobulin transfer in calves III. Amount of absorption. *Journal of Dairy Science*. 62:1902-1907.

Swan, H., S. M. Godden, R. Bey, S. Wells, J. Fetrow, y H. Chester- Jones. 2007. Passive transfer of immunoglobulin G and preweaning health in Holstein calves fed a commercial colostrum replacer. *Journal of Dairy Science*. 90:3857–3866.

Thompson, A. y Pauli, J. 1981. Colostral transfer of gamma glutamyl transpeptidase in calves. *New Zealand Veterinary Journal*. 29: 223–226.

Tizard, I. 2000. Inmunología Veterinaria. *Interamericana McGraw-Hill*. México, D.F. 6a Edición.

Trotz-Williams, L., Leslie, K., y Peregrine, A. 2008. Passive Immunity in Ontario Dairy Calves and Investigation of Its Association with Calf Management Practices. *Journal of Dairy Science*. 91: 3840–3849.

Trujillo, A. J., N. Castro, J. M. Quevedo, A. Arguello, J. Capote, y B. Guamis. 2007. Effect of heat and high-pressure treatments on microbiological quality and immunoglobulin G stability of caprine colostrum. *Journal of Dairy Science*. 90:833–839.

USDA. 2007. Dairy 2007, Part I: Reference of dairy cattle health and management practices in the United States, 2007. *USDA-APHISVS, CEAH*, Fort Collins, CO.

- USDA. 2008. Dairy 2007, Part III: Reference of dairy cattle health and management practices in the United States, 2007. *USDAAPHIS- VS, CEAH*, Fort Collins, CO.
- Valdivia, F.A. 1996. Biodisponibilidad de las Ig del calostro bovino sometido a condiciones de congelación. Tesis de maestría. *Universidad Autónoma de Aguascalientes*. México.
- Vermeer, A.W. y Norde, W. 2000. The thermal stability of immunoglobulin: Unfolding and aggregation of a multi-domain protein. *Biophysical Journal*; 78:394–404.
- Virtala, A. M. K., G. D. Mechor, Y. T. Grohn, y H. N. Erb. 1996. Morbidity from nonrespiratory diseases and mortality in dairy heifers during the first three months of life. *American Veterinary Medical Association*. 208:2043–2046.
- Wattiaux, M. 2002. Universidad de Wisconsin. Instituto Babcock. Disponible en la Web: <http://www.babcock.cals.wisc.edu>
- Weaver, D.M., J.W., Tyler, D.C., VanMetre, D.E., Hostetler, D. y Barrington, G.M. 2000. Passive transfer of colostral immunoglobulins in calves. *Journal of Veterinary Internal Medicine*. 14:569–577.
- Wheeler, T.T., Smolenski, G.A., Harris, D.P., Gupta, S.K., Haigh, B.J., Broadhurst, M.K., Molenaar, A.J., Stelwagen, K. 2012. Host-defence-related proteins in cows' milk. *Animal*. 6: 415-422.
- Wheeler, T.T., Hodgkinson, A.J., Prosser, C.G., y Davis, S.R. 2007. Immune components of colostrum and milk—A historical perspective. *Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia*.; 12: 237–247.
- Wells, S.J., Dargatz, D.A. y Ott, S.L. 1996. Factors associated with mortality to 21 days of life in dairy heifers in the United States. *Preventive Veterinary Medicine*. 29:9-19.
- Walker, A. 2010. Breast milk as the gold standard for protective nutrients. *Journal of Pediatrics*. 156: S3–S7.
- Wiley, A.S. 2012. Cow milk consumption, insulin-like growth factor-I, and human biology: A life history approach. *American Journal of Human Biology*. 24: 130–138

10. ANEXOS

10.1. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

10.1.1. ANOVA Simple - Proteína por Tratamiento.

Variable dependiente: Proteína (%)

Factor: Tratamiento ((P=1, NP=0))

Número de observaciones: 100

Número de niveles: 2

Resumen Estadístico para Proteína

<i>Tratamiento</i>	<i>Recuento</i>	<i>Promedio</i>	<i>Desviación Estándar</i>	<i>Coficiente de Variación</i>	<i>de</i>	<i>Mínimo</i>	<i>Máximo</i>	<i>Rango</i>
0	50	12.8426	0.692006	5.38837%		11.28	13.93	2.65
1	50	12.5714	0.882531	7.02015%		11.03	13.89	2.86
Total	100	12.707	0.80068	6.30109%		11.03	13.93	2.9

<i>Tratamiento</i>	<i>Sesgo Estandarizado</i>	<i>Curtosis Estandarizada</i>
0	-0.0497986	-1.31758
1	-1.00139	-1.50399
Total	-1.43171	-1.41006

Tabla ANOVA para Proteína por Tratamiento

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>de</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
Entre grupos	1.83874		1	1.83874	2.92	0.0904
Intra grupos	61.629		98	0.628867		
Total (Corr.)	63.4677		99			

Tabla de Medias para Proteina por Tratamiento con intervalos de confianza del 95.0%

			<i>Error Est.</i>		
<i>Tratamiento</i>	<i>Casos</i>	<i>Media</i>	<i>(s agrupada)</i>	<i>Límite Inferior</i>	<i>Límite Superior</i>
0	50	12.8426	0.112149	12.6852	13.0
1	50	12.5714	0.112149	12.414	12.7288
Total	100	12.707			

Pruebas de Múltiple Rangos para Proteina por Tratamiento

Método: 95.0 porcentaje Tukey HSD

<i>Tratamiento</i>	<i>Casos</i>	<i>Media</i>	<i>Grupos Homogéneos</i>
1	50	12.5714	X
0	50	12.8426	X

<i>Contraste</i>	<i>Sig.</i>	<i>Diferencia</i>	<i>+/- Límites</i>
0 - 1		0.2712	0.314742

* indica una diferencia significativa.

10.1.2. ANOVA Simple - Grasa por Tratamiento.

Variable dependiente: Grasa (%)

Factor: Tratamiento ((P=1, NP=0))

Número de observaciones: 100

Número de niveles: 2

Resumen Estadístico para Grasa

<i>Tratamiento</i>	<i>Recuento</i>	<i>Promedio</i>	<i>Desviación Estándar</i>	<i>Coficiente de Variación</i>	<i>de Mínimo</i>	<i>Máximo</i>	<i>Rango</i>
0	50	5.966	0.280386	4.69973%	5.5	6.5	1.0
1	50	5.928	0.294189	4.9627%	5.4	6.5	1.1
Total	100	5.947	0.286552	4.81843%	5.4	6.5	1.1

<i>Tratamiento</i>	<i>Sesgo Estandarizado</i>	<i>Curtosis Estandarizada</i>
0	0.0163968	-1.57701
1	0.1125	-1.3031
Total	0.0543919	-2.02246

Tabla ANOVA para Grasa por Tratamiento

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>de Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
Entre grupos	0.0361	1	0.0361	0.44	0.5101
Intra grupos	8.093	98	0.0825816		
Total (Corr.)	8.1291	99			

Tabla de Medias para Grasa por Tratamiento con intervalos de confianza del 95.0%

<i>Tratamiento</i>	<i>Casos</i>	<i>Media</i>	<i>Error Est. (s agrupada)</i>	<i>Límite Inferior</i>	<i>Límite Superior</i>
0	50	5.966	0.0406403	5.90897	6.02303
1	50	5.928	0.0406403	5.87097	5.98503
Total	100	5.947			

Pruebas de Múltiple Rangos para Grasa por Tratamiento

Método: 95.0 porcentaje Tukey HSD

<i>Tratamiento</i>	<i>Casos</i>	<i>Media</i>	<i>Grupos Homogéneos</i>
1	50	5.928	X
0	50	5.966	X

<i>Contraste</i>	<i>Sig.</i>	<i>Diferencia</i>	<i>+/- Límites</i>
0 - 1		0.038	0.114056

* indica una diferencia significativa.

10.1.3. ANOVA Simple - Brix Calostro por Tratamiento.

Variable dependiente: Brix Calostro

Factor: Tratamiento ((P=1, NP=0))

Número de observaciones: 100

Número de niveles: 2

Resumen Estadístico para Brix Calostro

Tratamiento	Recuento	Promedio	Desviación Estándar	Coficiente de Variación	Mínimo	Máximo	Rango
0	50	25.626	3.23796	12.6355%	20.9	32.6	11.7
1	50	26.316	2.67638	10.1702%	20.2	32.9	12.7
Total	100	25.971	2.9757	11.4578%	20.2	32.9	12.7

Tratamiento	Sesgo Estandarizado	Curtosis Estandarizada
0	1.1194	-1.00865
1	0.380394	0.48986
Total	0.909671	-0.81815

Tabla ANOVA para Brix Calostro por Tratamiento

Fuente	Suma de Cuadrados	de Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	11.9025	1	11.9025	1.35	0.2483
Intra grupos	864.723	98	8.82371		
Total (Corr.)	876.626	99			

Tabla de Medias para Brix Calostro por Tratamiento con intervalos de confianza del 95.0%

Tratamiento	Casos	Media	Error Est. (s agrupada)	Límite Inferior	Límite Superior
0	50	25.626	0.420088	25.0365	26.2155
1	50	26.316	0.420088	25.7265	26.9055
Total	100	25.971			

Pruebas de Múltiple Rangos para Brix Calostro por Tratamiento

Método: 95.0 porcentaje Tukey HSD

<i>Tratamiento</i>	<i>Casos</i>	<i>Media</i>	<i>Grupos Homogéneos</i>
0	50	25.626	X
1	50	26.316	X

<i>Contraste</i>	<i>Sig.</i>	<i>Diferencia</i>	<i>+/- Límites</i>
0 - 1		-0.69	1.17896

* indica una diferencia significativa.

10.1.4. ANOVA Simple - IgG Calostro por Tratamiento.

Variable dependiente: IgG Calostro ((mg/dL))

Factor: Tratamiento ((P=1, NP=0))

Número de observaciones: 100

Número de niveles: 2

Resumen Estadístico para IgG Calostro

<i>Tratamiento</i>	<i>Recuento</i>	<i>Promedio</i>	<i>Desviación Estándar</i>	<i>Coefficiente de Variación</i>	<i>Mínimo</i>	<i>Máximo</i>	<i>Rango</i>
0	50	109.0	10.3135	9.46189%	90.0	128.0	38.0
1	50	112.4	12.1269	10.789%	90.0	129.0	39.0
Total	100	110.7	11.3293	10.2343%	90.0	129.0	39.0

<i>Tratamiento</i>	<i>Sesgo Estandarizado</i>	<i>Curtosis Estandarizada</i>
0	-0.653837	-1.36595
1	-1.70796	-1.43819
Total	-1.48021	-2.16606

Tabla ANOVA para IgG Calostro por Tratamiento

Fuente	Suma de Cuadrados	de Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	289.0	1	289.0	2.28	0.1342
Intra grupos	12418.0	98	126.714		
Total (Corr.)	12707.0	99			

Tabla de Medias para IgG Calostro por Tratamiento con intervalos de confianza del 95.0%

Tratamiento	Casos	Media	Error Est. (s agrupada)	Límite Inferior	Límite Superior
0	50	109.0	1.59194	106.766	111.234
1	50	112.4	1.59194	110.166	114.634
Total	100	110.7			

Pruebas de Múltiple Rangos para IgG Calostro por Tratamiento

Método: 95.0 porcentaje Tukey HSD

Tratamiento	Casos	Media	Grupos Homogéneos
0	50	109.0	X
1	50	112.4	X

Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
0 - 1		-3.4	4.46774

* indica una diferencia significativa.

10.1.5. ANOVA Simple - IgG Cría por Tratamiento.

Variable dependiente: IgG Cría ((mg/dL))

Factor: Tratamiento ((P=1, NP=0))

Número de observaciones: 100

Número de niveles: 2

Resumen Estadístico para IgG Cría

Tratamiento	Recuento	Promedio	Desviación Estándar	Coficiente de Variación	Mínimo	Máximo	Rango
0	50	11.094	1.51286	13.6367%	8.8	13.8	5.0
1	50	11.504	1.32587	11.5253%	9.4	14.2	4.8
Total	100	11.299	1.43016	12.6574%	8.8	14.2	5.4

Tratamiento	Sesgo Estandarizado	Curtosis Estandarizada
0	1.07659	-1.63654
1	0.514689	-1.42016
Total	0.924907	-2.22985

Tabla ANOVA para IgG Cría por Tratamiento

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	4.2025	1	4.2025	2.08	0.1527
Intra grupos	198.287	98	2.02334		
Total (Corr.)	202.49	99			

Tabla de Medias para IgG Cría por Tratamiento con intervalos de confianza del 95.0%

Tratamiento	Casos	Media	Error Est. (s agrupada)	Límite Inferior	Límite Superior
0	50	11.094	0.201164	10.8117	11.3763
1	50	11.504	0.201164	11.2217	11.7863
Total	100	11.299			

Pruebas de Múltiple Rangos para IgG Cría por Tratamiento

Método: 95.0 porcentaje Tukey HSD

Tratamiento	Casos	Media	Grupos Homogéneos
0	50	11.094	X
1	50	11.504	X

Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
0 - 1		-0.41	0.564559

* indica una diferencia significativa.

10.1.6. ANOVA Simple - IgG Cría por Tratamiento.

Variable dependiente: IgG Cría ((mg/dL))

Factor: Tratamiento ((P=1, NP=0))

Número de observaciones: 100

Número de niveles: 2

Resumen Estadístico para IgG Cría

Tratamiento	Recuento	Promedio	Desviación Estándar	Coeficiente de Variación	Mínimo	Máximo	Rango
0	50	11.094	1.51286	13.6367%	8.8	13.8	5.0
1	50	11.504	1.32587	11.5253%	9.4	14.2	4.8
Total	100	11.299	1.43016	12.6574%	8.8	14.2	5.4

Tratamiento	Sesgo Estandarizado	Curtosis Estandarizada
0	1.07659	-1.63654
1	0.514689	-1.42016
Total	0.924907	-2.22985

Tabla ANOVA para IgG Cría por Tratamiento

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	4.2025	1	4.2025	2.08	0.1527
Intra grupos	198.287	98	2.02334		

Total (Corr.)	202.49	99			
---------------	--------	----	--	--	--

Tabla de Medias para IgG Críapor Tratamiento con intervalos de confianza del 95.0%

			<i>Error Est.</i>		
<i>Tratamiento</i>	<i>Casos</i>	<i>Media</i>	<i>(s agrupada)</i>	<i>Límite Inferior</i>	<i>Límite Superior</i>
0	50	11.094	0.201164	10.8117	11.3763
1	50	11.504	0.201164	11.2217	11.7863
Total	100	11.299			

Pruebas de Múltiple Rangos para IgG Críapor Tratamiento

Método: 95.0 porcentaje Tukey HSD

<i>Tratamiento</i>	<i>Casos</i>	<i>Media</i>	<i>Grupos Homogéneos</i>
0	50	11.094	X
1	50	11.504	X

<i>Contraste</i>	<i>Sig.</i>	<i>Diferencia</i>	<i>+/- Límites</i>
0 - 1		-0.41	0.564559

* indica una diferencia significativa.

10.1.7. ANOVA Simple - BMA por Tratamiento.

Variable dependiente: BMA ((UFC/mL))

Factor: Tratamiento ((P=1, NP=0))

Número de observaciones: 100

Número de niveles: 2

Resumen Estadístico para BMA

<i>Tratamiento</i>	<i>Recuento</i>	<i>Promedio</i>	<i>Desviación Estándar</i>	<i>Coefficiente de Variación</i>	<i>Mínimo</i>	<i>Máximo</i>	<i>Rango</i>
0	50	27781.6	2251.65	8.10484%	24043.0	30928.0	6885.0
1	50	7469.86	870.084	11.6479%	6100.0	8851.0	2751.0
Total	100	17625.7	10347.3	58.7059%	6100.0	30928.0	24828.0

<i>Tratamiento</i>	<i>Sesgo Estandarizado</i>	<i>Curtosis Estandarizada</i>
0	-0.32711	-2.0699
1	-0.25395	-2.12857
Total	0.242143	-3.94379

ADVERTENCIA: El sesgo estandarizado y/o la curtosis estandarizada se encuentran fuera del rango de -2 a +2 para los 2 niveles de Tratamiento. Esto indica algo de no normalidad significativa en los datos, lo cual viola el supuesto de que los datos provienen de distribuciones normales. Tal vez quisiera transformar los datos, ó utilizar la prueba de Kruskal-Wallis para comparar las medianas en lugar de las medias.

Tabla ANOVA para BMA por Tratamiento

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>de Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
Entre grupos	1.03141E10	1	1.03141E10	3540.13	0.0000
Intra grupos	2.85522E8	98	2.91349E6		
Total (Corr.)	1.05997E10	99			

Tabla de Medias para BMA por Tratamiento con intervalos de confianza del 95.0%

<i>Tratamiento</i>	<i>Casos</i>	<i>Media</i>	<i>Error Est. (s agrupada)</i>	<i>Límite Inferior</i>	<i>Límite Superior</i>
0	50	27781.6	241.392	27442.9	28120.3
1	50	7469.86	241.392	7131.13	7808.59
Total	100	17625.7			

Pruebas de Múltiple Rangos para BMA por Tratamiento

Método: 95.0 porcentaje Tukey HSD

Tratamiento	Casos	Media	Grupos Homogéneos
1	50	7469.86	X
0	50	27781.6	X

Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
0 - 1	*	20311.7	677.457

* indica una diferencia significativa.

Prueba de Kruskal-Wallis para BMA por Tratamiento

Tratamiento	Tamaño Muestra	Rango Promedio
0	50	75.5
1	50	25.5

Estadístico = 74.2597 Valor-P = 0.0

10.1.8. ANOVA Simple - CTP por Tratamiento.

Variable dependiente: Coliformes ((UFC/mL))

Factor: Tratamiento ((P=1, NP=0))

Número de observaciones: 100

Número de niveles: 2

Resumen Estadístico para Coliformes

Tratamiento	Recuento	Promedio	Desviación Estándar	Coficiente de Variación	Mínimo	Máximo	Rango
0	50	138.0	14.708	10.658%	100.0	160.0	60.0
1	50	0.0	0.0	%	0.0	0.0	0.0
Total	100	69.0	70.1153	101.616%	0.0	160.0	160.0

<i>Tratamiento</i>	<i>Sesgo Estandarizado</i>	<i>Curtosis Estandarizada</i>
0	-0.578627	-0.947997
1		
Total	0.264193	-3.98754

Tabla ANOVA para Coliformes por Tratamiento

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
Entre grupos	476100.	1	476100.	4401.68	0.0000
Intra grupos	10600.0	98	108.163		
Total (Corr.)	486700.	99			

Tabla de Medias para Coliformes por Tratamiento con intervalos de confianza del 95.0%

<i>Tratamiento</i>	<i>Casos</i>	<i>Media</i>	<i>Error Est. (s agrupada)</i>	<i>Límite Inferior</i>	<i>Límite Superior</i>
0	50	138.0	1.4708	135.936	140.064
1	50	0.0	1.4708	-2.06388	2.06388
Total	100	69.0			

Pruebas de Múltiple Rangos para Coliformes por Tratamiento

Método: 95.0 porcentaje Tukey HSD

<i>Tratamiento</i>	<i>Casos</i>	<i>Media</i>	<i>Grupos Homogéneos</i>
1	50	0.0	X
0	50	138.0	X

<i>Contraste</i>	<i>Sig.</i>	<i>Diferencia</i>	<i>+/- Límites</i>
0 - 1	*	138.0	4.12776

* indica una diferencia significativa.

Prueba de Kruskal-Wallis para Coliformes por Tratamiento

<i>Tratamiento</i>	<i>Tamaño Muestra</i>	<i>Rango Promedio</i>
0	50	75.5

1	50	25.5
---	----	------

Estadístico = 85.3513 Valor-P = 0.0

10.1.9. ANOVA Simple - GDP por Tratamiento.

Variable dependiente: GDP (kg/día)

Factor: Tratamiento ((P=1, NP=0))

Número de observaciones: 100

Número de niveles: 2

Resumen Estadístico para GDP

Tratamiento	Recuento	Promedio	Desviación Estándar	Coefficiente de Variación	Mínimo	Máximo	Rango
0	50	0.98208	0.09434	9.60614%	0.808	1.103	0.295
1	50	1.11782	0.0595012	5.32297%	1.002	1.246	0.244
Total	100	1.04995	0.103972	9.9026%	0.808	1.246	0.438

Tratamiento	Sesgo Estandarizado	Curtosis Estandarizada
0	-1.33876	-1.72059
1	-1.06322	-0.723037
Total	-2.82426	-0.449187

Tabla ANOVA para GDP por Tratamiento

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	0.460634	1	0.460634	74.05	0.0000
Intra grupos	0.609581	98	0.00622021		
Total (Corr.)	1.07021	99			

Tabla de Medias para GDP por Tratamiento con intervalos de confianza del 95.0%

Tratamiento	Casos	Media	Error Est. (s agrupada)	Límite Inferior	Límite Superior
0	50	0.98208	0.0111537	0.966429	0.997731
1	50	1.11782	0.0111537	1.10217	1.13347
Total	100	1.04995			

Pruebas de Múltiple Rangos para GDP por Tratamiento

Método: 95.0 porcentaje Tukey HSD

<i>Tratamiento</i>	<i>Casos</i>	<i>Media</i>	<i>Grupos Homogéneos</i>
0	50	0.98208	X
1	50	1.11782	X

<i>Contraste</i>	<i>Sig.</i>	<i>Diferencia</i>	<i>+/- Límites</i>
0 - 1	*	-0.13574	0.0313024

* indica una diferencia significativa.

10.2. DETERMINACIÓN DE PROTEÍNAS POR KJELDAHL (NOM-155-SCFI-2012)

Este método se basa en la descomposición de los compuestos de nitrógeno orgánico por ebullición con ácido sulfúrico. El hidrógeno y el carbón de la materia orgánica se oxidan para formar agua y bióxido de carbono. El ácido sulfúrico se transforma en sulfato, el cual reduce el material nitrogenado a sulfato de amonio.

El amoniaco se libera después de la adición de hidróxido de sodio y se destila recibiendo en una solución al 2 % de ácido bórico. Se titula el nitrógeno amoniacal con una solución valorada de ácido, cuya normalidad depende de la cantidad de nitrógeno que contenga la muestra. En este método se usa el sulfato de cobre como catalizador y el sulfato de potasio para aumentar la temperatura de la mezcla y acelerar la digestión.

Reactivos.

- Ácido sulfúrico concentrado al 98 % (libre de nitrógeno);
- Hidróxido de sodio al 40 %;
- Sulfato de Potasio;
- Sulfato de Cobre pentahidratado;
- Ácido bórico al 2 %;
- Solución de ácido clorhídrico 0,1 N;
- Indicador Wesslob;
- Tabletas Kjeldahl comerciales.

Materiales.

- Probeta de 50 mL;
- Material común de laboratorio.

Preparación de la muestra.

Agregar al tubo de digestión 12 g de sulfato de potasio y 1 g de sulfato de cobre pentahidratado, o dos tabletas Kjeldahl comerciales. Calentar la leche a $38\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$. Mezclar la muestra para homogeneizar.

Pesar $5\text{ mL} \pm 0,1\text{ mL}$ de la muestra caliente e inmediatamente colocarla en el tubo de digestión. (Nota: Los pesos deben ser registrados con una exactitud de 0,0001 g). Adicionar 20 mL de ácido sulfúrico. Cada día se deberá correr un blanco (todos los reactivos sin muestra).

Procedimiento.

Digestión: Al inicio se fija una temperatura baja en el equipo de digestión ($180\text{ }^{\circ}\text{C}$ a $230\text{ }^{\circ}\text{C}$) para evitar la formación de espuma. Se colocan los tubos, con el extractor conectado en el equipo de digestión. El vacío debe ser suficientemente bueno para eliminar los vapores.

Digerir por 30 minutos o hasta que se formen vapores blancos. Incrementar la temperatura de $410\text{ }^{\circ}\text{C}$ a $430\text{ }^{\circ}\text{C}$ y digerir hasta que se aclare la solución. Podría ser necesario incrementar la temperatura en forma gradual, cada 20 minutos, para el control de la espuma. Evitar que la espuma dentro del tubo alcance el extractor o llegue a una distancia de 4-5 cm del borde superior del tubo.

Después de que la solución se aclare (cambio de color azul claro a verde), continúe la ebullición cuando menos por una hora. El tiempo aproximado de digestión es de 1,75 a 2,5 horas. Al término de la digestión, la solución debe ser clara y libre de material sin digerir.

Enfriar la solución a temperatura ambiente (aproximadamente por 25 minutos). La solución digerida debe ser líquida con pequeños cristales en el fondo del tubo (la cristalización excesiva indica poco ácido sulfúrico residual al fin de la digestión y podría generar bajos resultados. Para reducir las pérdidas de ácido durante la digestión, reducir la tasa de extracción de vapores). Después de enfriar la solución a temperatura ambiente, adicionar

85 mL de agua (el blanco puede requerir 100 mL) a cada tubo, tape para mezclar y deje enfriar a temperatura ambiente.

Cuando se adiciona agua a temperatura ambiente se pueden formar algunos cristales, para después integrarse nuevamente a la solución; esto es normal. Los tubos se pueden tapar para llevar a cabo la destilación posteriormente.

Destilación: Coloque la solución de hidróxido de sodio al 50% (o 40%) en el depósito de álcali de la unidad de destilación. Ajuste el volumen de dosificación a 55 mL de NaOH al 50 % (65 mL en el caso de NaOH al 40%).

Coloque el tubo de digestión que contiene la solución en la unidad de destilación. Coloque un matraz Erlenmeyer de 500 mL con 50 mL de la solución de ácido bórico al 4% con indicador sobre la plataforma de recepción, asegurando que el tubo del condensador se encuentre dentro de la solución de ácido bórico.

Destilar hasta obtener un volumen de 150 mL. Retirar el matraz de recepción. Titular el destilado con HCl 0,1 N utilizando el indicador Wesslob o el potenciómetro. Registrar el volumen utilizado de HCl con una exactitud de 0,05 mL.

Correr como estándar glicina y sulfato de amonio con pureza de 99% para determinar el porcentaje de recuperación del método.

% recuperación sulfato de amonio = 99 % Glicina = 98 %

10.3. GRASA BUTÍRICA (NOM-155-SCFI-2012)

La grasa existe en la leche en forma de emulsión que se estabiliza por medio de los fosfolípidos y las proteínas. El método Gerber se basa en la ruptura de la emulsión por la adición de ácido sulfúrico concentrado. La grasa libre puede separarse por centrifugación por la adición de una pequeña cantidad de alcohol amílico, el cual actúa como un agente tensoactivo que permite la separación nítida de las capas de grasa y la capa ácido-acuosa.

Reactivos.

Todos los reactivos que se indiquen deben ser grado analítico; cuando se indique agua, debe entenderse agua destilada.

Ácido sulfúrico puro, de peso específico 1,820 +/- 0,005 a 20 °C aproximadamente al 90 %, libre de óxido de nitrógeno y otras impurezas. Se puede preparar a partir de H₂SO₄ 98 % w/w, midiendo aproximadamente 908 mL de éste más 160 mL de agua (verificar sistemáticamente el peso específico del ácido sulfúrico).

Alcohol amílico 98 % v/v, densidad a 20 °C de 0,808 a 0,818 g/mL. En lugar de alcohol amílico se puede utilizar alcohol iso-amílico libre de grasa y furfurool, de peso específico de 0,810-0,812 a 20 °C.

Tanto el ácido sulfúrico como el alcohol de cada remesa debe someterse a un control de pureza, colocando en un butirómetro, 11 mL de agua destilada, añadir 10 mL de ácido sulfúrico y 1 mL de alcohol amílico, cerrar el butirómetro y centrifugar durante 3 minutos. Después de 24 h de reposo, no debe observarse ningún trozo de grasa visible en la superficie.

Materiales.

- Gradillas de acero inoxidable o de material plástico resistente a los ácidos para los butirómetros.

- Medidor automático o pipeta de seguridad para liberar $10,0 \text{ mL} \pm 0,2 \text{ mL}$ de ácido sulfúrico.
- Medidor automático o pipeta de seguridad para liberar $1,0 \text{ mL} \pm 0,05 \text{ mL}$ de alcohol amílico.
- Pipetas volumétricas de $11 \text{ mL}/20 \text{ }^\circ\text{C}$.
- Tapones tipo Gerber, que consiste de un casquete de goma fijado a un juego metálico de cabeza plana, al cual se le adapta un pulsador por el orificio que define el aro metálico del tapón.
- Centrífuga capaz de girar a una velocidad media de $1\ 200 \text{ rpm}$ y puede o no tener control de temperatura.
- Baño María con control de temperatura para mantener a $65 \text{ }^\circ\text{C} \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$ y altura tal para sumergir los butirómetros en posición vertical, con toda la escala completamente inmersa.
- Termómetro de mercurio con capacidad para medir $65 \text{ }^\circ\text{C} \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$.

Preparación de la muestra.

Antes de analizar las muestras de leche deben atemperarse a $20 \text{ }^\circ\text{C}$. Es preciso alcanzar esta temperatura, porque todas las pipetas aforadas están calibradas a $20 \text{ }^\circ\text{C}$.

Si a $20 \text{ }^\circ\text{C}$ no se obtiene un buen reparto de la materia grasa, se calienta la muestra de $35 \text{ }^\circ\text{C}$ - $40 \text{ }^\circ\text{C}$, se mezcla con cuidado y se enfría rápidamente a $20 \text{ }^\circ\text{C} \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$.

Una vez atemperada a $20 \text{ }^\circ\text{C}$, las muestras de leche se deben mezclar cuidadosamente, para evitar la formación de espuma, y permitir un reparto homogéneo de la materia grasa, inmediatamente proceder de la siguiente manera:

Procedimiento.

-Colocar los butirómetros limpios y secos en una gradilla, se introducen en cada uno de ellos 10 mL de ácido sulfúrico, usando el medidor automático, cuidando de no impregnar el cuello del butirómetro.

-Mezclar la muestra a analizar, invirtiendo el recipiente tapado en tres o cuatro tiempos e inmediatamente medir 11 mL de leche (realizar el análisis por duplicado), depositándola en los butirómetros.

-La punta de la pipeta debe estar apoyada en posición oblicua (aproximadamente en ángulo de 45°) contra la pared interna del cuello del butirómetro, para permitir que la leche se deslice a lo largo del vidrio y se superponga al ácido sulfúrico sin producir rastros de ennegrecimiento (evitar que el ácido y la leche se mezclen).

-Para terminar, se añade 1,0 mL de alcohol amílico dentro de cada butirómetro por medio del medidor automático.

-Tapar el butirómetro, utilizando el pulsador como punto de presión.

-Agitar los butirómetros en dos tiempos; en un primer tiempo se debe realizar una agitación vigorosa, sin interrupción y sin inversiones, hasta conseguir que la leche y el ácido sulfúrico se mezclen y la proteína se disuelva.

-Posteriormente invertir los butirómetros unas cuantas veces, permitiendo que el ácido de la sección de la escala graduada y el de la ampolla terminal se mezclen. La agitación termina cuando no queden vestigios de caseína sin disolver.

-Durante esta operación se recomienda tener el butirómetro envuelto en una tela, ya que la mezcla de ácido sulfúrico con la leche ocasiona una reacción exotérmica.

-Inmediatamente colocar los butirómetros en la centrífuga.

-Centrifugar los butirómetros durante 5 minutos, a la velocidad de 1000 a 1200 rpm.

-Una vez concluida la centrifugación, colocar los butirómetros, con la escala hacia arriba, en un baño María a 65 °C, durante 5 min 10 min (tiempo necesario para permitir la

separación total de la grasa), es imprescindible que la capa de la grasa en la escala se mantenga enteramente inmersa en el agua caliente.

-Remover el butirómetro del baño de agua y alzarlo verticalmente hasta que el menisco de la columna de grasa esté al nivel de los ojos. Ajustar la columna de grasa, girando con cuidado el tapón hasta colocar los límites de la capa de grasa dentro de la escala, haciendo coincidir la parte inferior de la capa de grasa con una de las divisiones de la escala del butirómetro.

-La diferencia entre esta división y la correspondiente al menisco de la parte superior de la capa de grasa, indica el contenido de grasa de la leche en porcentaje w/v, repetir la centrifugación por 5 minutos y leer el resultado, informar este último.

10.4. REFRACTÓMETRO BRIX

La investigación realizada por Biemann *et al.* (2010) determinó que un valor Brix de 22% es adecuado para determinar si el calostro es de una buena calidad (calostro debe medir e 22%). Un valor Brix de 22% será equivalente a 50 gramos por litro de IgG, que es donde comienza la zona verde en el calostrómetro (es decir, de buena calidad).

Metodo de referencia: Quigley *et al.*, (2002)

Procedimiento:

-Descongelar las muestras de calostro, homogenizarlas para obtener una dispersión adecuada del contenido de la muestra y dejarlas listas para ser analizadas.

-Agregar alrededor de tres gotitas de la muestra de calostro en el prisma del refractómetro Brix, tapar la muestra con el cubre objetos y tomar la lectura.

-Luego de cada medición, el refractómetro Brix se limpia para que no quede ningún resto de calostro que pueda contaminar la próxima muestra.

10.5. REFRACTÓMETRO DE MANO

Método de referencia: Quigley (1999) y Morril, *et al.* (2015).

Procedimiento:

-Extraer 10 ml de sangre de la vena yugular del ternero y volcar en un tubo de ensayo rotulado (identificación del animal: caravana, fecha)

-Dejar que la sangre coagule para separar el sobrenadante (suero); aproximadamente se consigue extraer de 2 a 3 ml que se trasvasan a un frasquito idénticamente rotulado.

-Una o dos gotas de suero en el prisma, tapar la muestra con el cubreobjetos y ver a través del ocular del instrumento, en donde se observa una franja de color azul que indica la cantidad de proteína total en el suero.

10.6. CALOSTRÓMETRO

Método de referencia: Fleenor y Stott, (1980).

Procedimiento:

-Volcar el primer calostro dentro de la probeta hasta ocupar más o menos 30 cm de altura y asegurarse que en la superficie del líquido no haya burbujas que compliquen la lectura de la escala.

-Sumergir el densímetro suavemente en la probeta tratando de no desbordar.

-Después de unos segundos, levantar con cuidado el densímetro y leer. Vamos a ver dos escalas: escala verde: marca los gramos por litro de Ig que tiene ese calostro y escala roja: en función de la concentración de Ig de ese calostro, marca qué cantidad mínima debe tomar el ternero.

10.7. CUANTIFICACIÓN DE IgG EN LECHE Y SANGRE. ELABORACION DE CURA PATRÓN.

La prueba de precipitación de sulfito de sodio, es efectiva y rápida, mediante ésta es posible tamizar un elevado número de crías en un mínimo tiempo, y con un equipo básico, lo cual hace posible su utilización en condiciones de campo. Se basa en la precipitación de las Inmunoglobulinas del suero por las sales del sulfito de sodio, con una confiabilidad aproximada del 93%. (Medina, 1994). En caso de titulación de Inmunoglobulinas se observará turbidez en forma inmediata y la formación de un precipitado al cabo de 30 a 60 minutos.

Las inmunoglobulinas o anticuerpos se encargan de reconocer un antígeno y de enviar señales al interior de la célula B para inducir una respuesta inmunológica efectiva contra el mismo. La cromatografía de afinidad, su propósito, es obtener la IgG purificada; para lograr esto se hacen lavados con amortiguador de unión en los que se induce la unión de la proteína A y la IgG. Posteriormente estas uniones se rompen utilizando un amortiguador de elución para así obtener la IgG purificada.

Otro método es al utilizar ácido bicinconónico BCA para cuantificar la IgG mediante la realización de una curva estándar de concentración conocida de una proteína estándar, en este caso albúmina de suero bovino se corrigieron los valores obtenidos de las absorbancias de las muestras de IgG con concentración desconocida. Método de referencia: Valdivia (1994).

Procedimiento:

Se trabajó con 50 ml. de calostro de Bovino y 30 ml. de sangre en tubos sin anticoagulante.

Para el calostro se refrigeró a 4 °C y se separó la grasa, el calostro semidescremado se colocó en tubos eppendorf para centrifugar a 14000 rpm durante 5 min, se separó el sobrenadante y se congeló a -20°C.

Pasadas 24 horas se descongeló y se centrifugó a 13200 rpm durante 30min y nuevamente se retiró el sobrenadante, esto se realizó 2 veces.

Se procedió a medir el suero de leche y sangre con el kit de SPINREACT para Inmunoglobulina G, menciona que para sacar la concentración de IgG hay que agregar los siguientes reactivos

Reactivo R1	800 µL
Muestra ó Calibrador	10 µL
5. Mezclar y leer la absorbancia (A ₁) después de la adición de la muestra.	
6. Inmediatamente después, pipetear en la cubeta:	
Reactivo R2	200 µL

Curva patrón:

En esta parte se trabajó con seis diferentes diluciones siguiendo la tabla:

Dilución calibrador	1	2	3	4	5	6
Calibrador (µL)	--	10	25	50	75	100
CINa 9 g/L (µL)	100	90	75	50	25	-
Factor	0	0,1	0,25	0,5	0,75	1,0

Una vez teniendo las diluciones se realizó la siguiente tabla:

Reactivo R1	800 µL
Muestra ó Calibrador	10 µL
5. Mezclar y leer la absorbancia (A ₁) después de la adición de la muestra.	
6. Inmediatamente después, pipetear en la cubeta:	
Reactivo R2	200 µL

En la parte de muestra o calibrador se colocó la dilución del calibrador de la tabla anterior. Finalmente se multiplica el factor de la tabla anterior por la concentración del calibrador para IgG. Para obtener la concentración de inmunoglobulina en mg/dL.

TUBO	Factor	Concentración	mg/dL.
1	0	2780	0
2	0.1	2780	278
3	0.25	2780	695
4	0.5	2780	1390
5	0.75	2780	2085
6	1	2780	2780

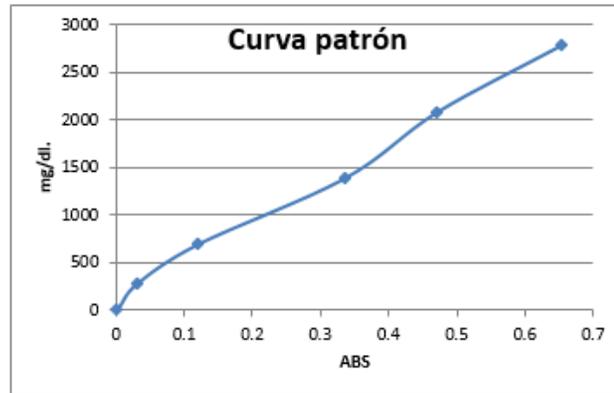
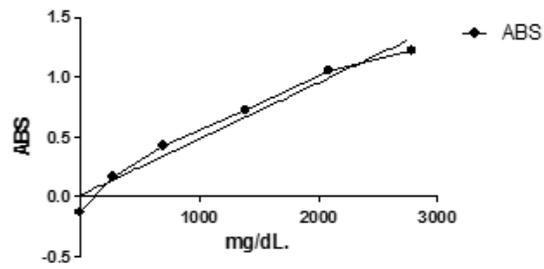
La curva patrón resultante fue la siguiente:

CURVA DE CALIBRACIÓN ESPECTRO CAVY

mg/dL	ABS
0	0.0381
278	0.3868
695	0.6303
1390	1.0439
2085	1.168
2780	1.3218

mg/dL	γ^2
0	0.001296
278	0.030276
695	0.120409
1390	0.3364
2085	0.471969
2780	0.652864

NUEVA CURVA PATRÓN



10.8. METODOLOGÍA DE TURBIDEZ CON SULFATO DE ZINC.

Método de referencia: Valdivia (1994).

-Preparación de la muestra:

Hervir 500 mL de agua destilada.

Pesar 104 mg de Sulfato de zinc heptahidratado KARAL® en una balanza analítica ADAM®.

Dejar enfriar los 500 mL de agua y agregar el sulfato de zinc heptahidratado KARAL®.

Mezclar y vaciar en un frasco ámbar y cubrir la boquilla con PARFILM®.

Mantener en refrigeración.

-Pipetear 6 mL del reactivo preparado en un tubo de ensaye.

-Agregar 100 μ de muestra.

-Mezclar en un VORTEZ GENIE7® de 15 a 20 segundos.

-Incubar a temperatura ambiente durante 1 hora.

-Encender el espectrofotómetro CARY 100 BIO VARIANS® 15 minutos antes de su uso y tomar las lecturas.

10.9. DETERMINACION DE GÉNERO DE BACTERIAS. PRUEBAS BIOQUÍMICAS PRIMARIAS

Método de referencia: Mc Faddin (2003).

10.9.1. Tinción de GRAM.

Reactivos:

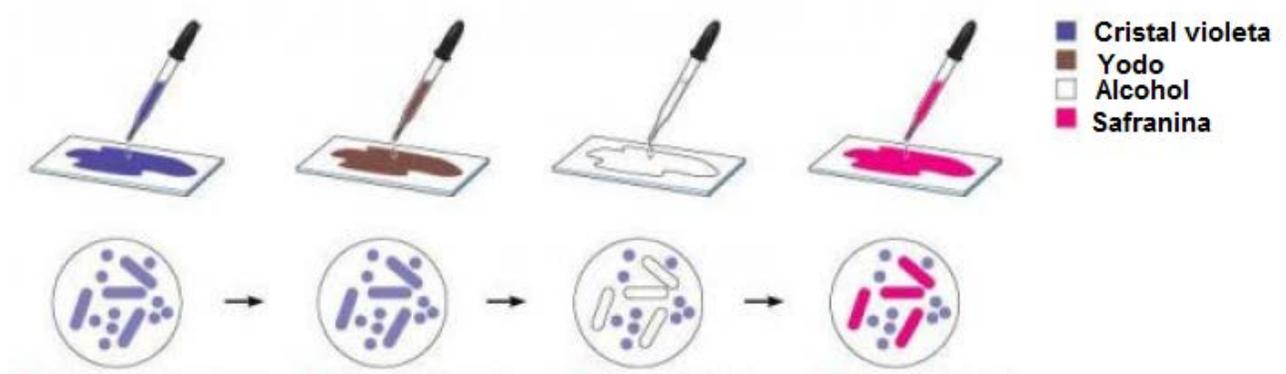
- Agua estéril para realizar el frotis.
- Cristal violeta también conocido como violeta de genciana.
- Safranina.
- Una mezcla de alcoholacetona
- Agua corriente para enjuagar.

Frotis.

1. Con la ayuda de un mechero, flamear un asa bacteriológica hasta el rojo vivo y esperar a que enfríe un poco.
2. Tomar con el asa una gota de agua estéril y agregarla en un portaobjetos.
3. Flamear nuevamente el asa y esperar a que enfríe.
4. Tomar con el asa un poco de muestra bacteriana a partir de una colonia aislada.
5. Después agregar la muestra en la gota de agua que está en el portaobjetos y homogeneizar suavemente con movimientos circulares.
6. Esperar que seque al aire libre o poner durante uno o dos segundos con la llama de un mechero para fijar la muestra, teniendo en cuenta que el calor no debe ser directo (sólo se pasa por la llama), puesto que el calor excesivo puede cambiar la morfología celular de las bacterias a observar.

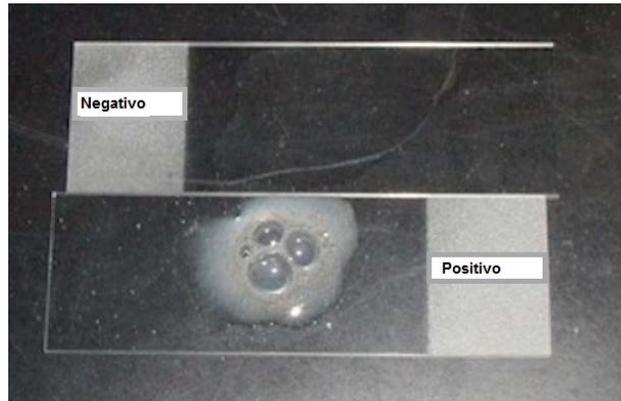
Tinción:

1. Agregar cristal violeta, solo el suficiente para que se cubra el extendido bacteriano. Dejar actuar durante 60 segundos.
2. Agregar el lugol, solo el suficiente, dejar actuar durante 60 segundos.
3. Enjuagar con agua corriente.
4. Agregar una o dos gotas de alcoholacetona e inmediatamente enjuagar con agua corriente.
5. Agregar Safranina, solo la suficiente, Dejar actuar durante 60 segundos.
6. Enjuagar con agua corriente.
7. Dejar secar a temperatura ambiente.
8. Observar en un microscopio óptico con un objetivo 100X usando aceite de inmersión.



10.9.2. Prueba de la catalasa.

El reactivo utilizado en la prueba es el peróxido de hidrogeno al 30%, hay diferentes técnicas para realizar la prueba la más común es poner una gota de peróxido en el portaobjetos y posteriormente con un palillo plano tomar un poco de bacteria a partir de una colonia aislada, si se observa el burbujeo generalmente intenso significa que hay producción de oxígeno por lo tanto se entiende que hay presencia de la enzima catalasa., hay bacterias que dan una reacción positiva débil aunque son las menos.



10.9.3. Prueba de coagulasa.

Colocar una gota estéril de agua destilada o solución fisiológica (NaCl al 0.85%) sobre un portaobjeto transparente y limpio.

Emulsionar con suavidad una suspensión densa de microorganismos provenientes de un cultivo o de una asada de una colonia pura aislada en un medio sólido en una gota de solución fisiológica.

Con suavidad, mezclar una pequeña asada de plasma humano fresco probado con anterioridad en la suspensión de estafilococos; la mezcla debe ser homogénea.

Colocar un microorganismo control positivo y uno negativo en el mismo portaobjeto para ser probado de manera simultánea. Observar la inmediata formación de precipitado microscópico en forma de grumos blancos. Un resultado positivo por lo general ocurre dentro de los 5-20 segundos. El resultado negativo se considera como tal si la coagulación no ocurre dentro de los 3-4 minutos.

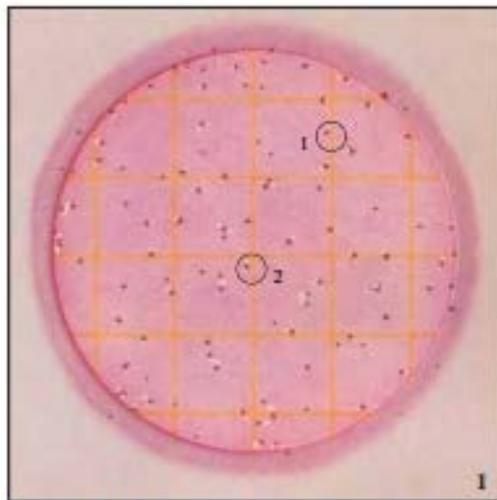


10.10. RECuento DE COLIFORMES (GUIA PETRIFILM™)

Esta guía sirve para familiarizarse con los resultados obtenidos en las placas 3M™ Petrifilm™ para Recuento de Coliformes (CC). Para más información, contactar con el distribuidor oficial de Productos 3M Microbiology.

Las placas Petrifilm CC contienen los nutrientes del Violeta Rojo Bilis (VRB) modificado, un agente gelificante soluble en agua fría y un indicador de tetrazolio que facilita la enumeración de colonias. El film superior atrapa el gas producido por la fermentación de la lactosa por los coliformes.

La ISO define los coliformes por su capacidad de crecer en medios específicos y selectivos. El método ISO 4832, que enumera los coliformes por la técnica del recuento de colonias, define los coliformes por el tamaño de las colonias y la producción de ácido en el Agar VRB con lactosa (VRBL). En las placas Petrifilm CC, estos coliformes productores de ácido se muestran como colonias rojas con o sin gas (ver Círculo 1).

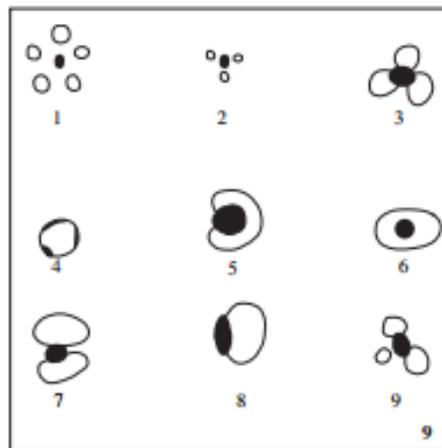


Recuento de colonias productoras de gas : 75
Recuento de colonias no productoras de gas : 24
Recuento total : 99

El método ISO 4831, que enumera los coliformes por el método del Número Más Probable (NMP), define los coliformes por su capacidad de crecer y producir gas a partir de la lactosa en un caldo selectivo. En las placas Petrifilm CC, estos coliformes se muestran como colonias rojas asociadas a gas (ver Círculo 2).

La AOAC INTERNATIONAL y la FDA (Food and Drug Administration) / BAM definen los coliformes como bacilos Gram negativos que producen ácido y gas a partir de la lactosa durante la fermentación metabólica.

Las colonias de coliformes que crecen en las placas Petrifilm CC producen ácido que provoca que el indicador de pH oscurezca el color del gel; el gas atrapado alrededor de las colonias indica coliformes



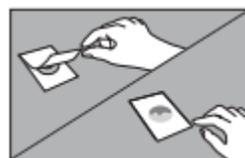
Arriba se muestran varios ejemplos de burbujas asociadas a una colonia. Todos ellos se deben contar.

Preparación de la muestra:

-Pesar o pipetear el producto alimenticio en un contenedor estéril adecuado, como una bolsa tipo Stomacher, frasco de dilución, bolsa Whirl-Pak®, o cualquier otro contenedor estéril. Para el caso de calostro, se realizaron diluciones 1:10 en diluyente petona previamente esterilizado.



-Bajar el film superior con cuidado evitando introducir burbujas de aire. No dejarlo caer.



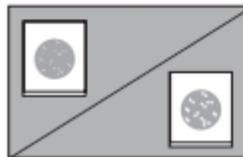
Con la cara lisa hacia abajo, colocar el aplicador en el film superior sobre el inóculo. Con cuidado, ejercer una presión sobre el aplicador para repartir el inóculo sobre el área circular antes de que se forme el gel. No girar ni deslizar el aplicador. Levantar el aplicador. Esperar al menos un minuto a que solidifique el gel.



-Incubar las placas cara arriba en pilas de hasta 20 placas. El tiempo e incubación varía según el método.



-Las placas Petrifilm pueden leerse con un contador de colonias standard u otra lente de aumento iluminada.



-Las colonias pueden aislarse para una posterior identificación. Levantar el film superior y seleccionar la colonia del gel.



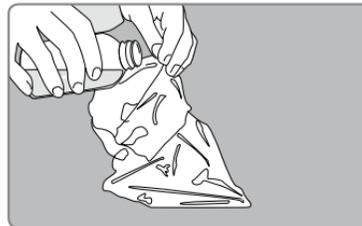
10.11. RECuento DE AEROBIOS (GUIA PETRIFILM™)

Procedimiento:

-Preparar una dilución de la muestra de alimento 1:10 o superior. Pesar o pipetear la muestra en una bolsa Whirlpac, bolsa Stomacher, botella de dilución o cualquier otro recipiente estéril apropiado.



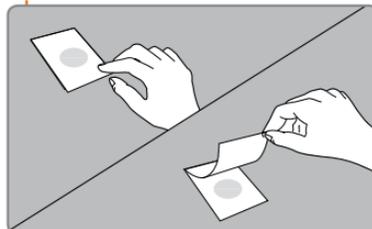
Añadir el diluyente apropiado. Usar diluyentes estándar tales como tampón fosfato, agua de peptona, tampón de Butterfield, solución Ringer, peptona-sal, agua destilada y otros. No usar tampones que contengan citrato de sodio o tiosulfato.



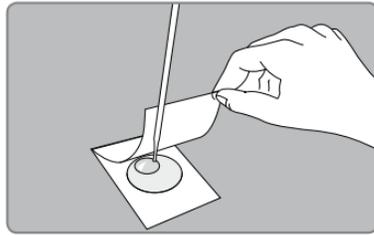
Mezclar u homogeneizar la muestra mediante los métodos usuales.



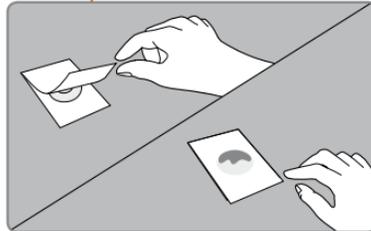
Disponer la placa Petrifilm en una superficie plana. Levantar el film superior.



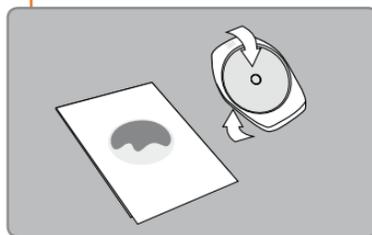
Pipetear 1 ml de muestra al centro aproximadamente del film inferior. Mantener la pipeta en posición vertical. No tocar el film inferior mientras se pipetea.



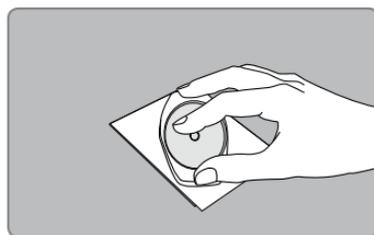
Soltar el film superior y dejarlo caer. No deslizar el film hacia abajo.



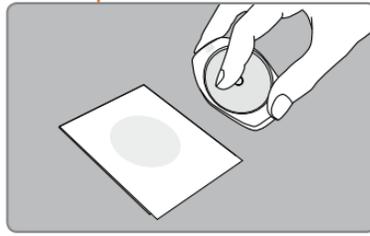
Colocar el aplicador en el film superior bien centrado sobre el inóculo. Usar el aplicador con la cara rebajada hacia abajo (cara lisa hacia arriba).



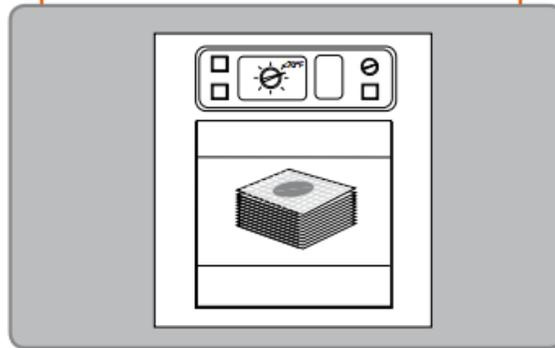
Aplicar presión de manera suave sobre el aplicador para distribuir el inóculo por toda la zona circular. No mover ni girar el aplicador.



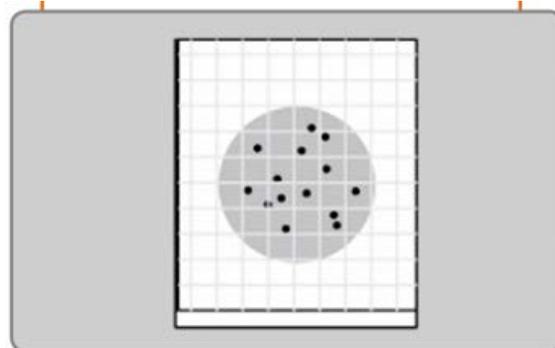
Levantar el aplicador. Esperar 1 minuto para que se solidifique el gel.



Incubar las placas Petrifilm cara arriba y apiladas en grupos de no más de 20 placas. Incubar a $30 \pm 1^{\circ}\text{C}$ durante 72 ± 2 horas para cualquier tipo de alimento. Consultar otras condiciones particulares de incubación.



Leer las placas. Usar un lector de placas 3MTM PetrifilmTM, contador de colonias estándar Quebec u otros. No usar luz de fondo para la lectura de esta placa, usar luz directa.



10.12. INMUNODIFUSIÓN RADIAL

Esta técnica permite cuantificar de manera sencilla y económica inmunoglobulinas de isotipo G, M y A o antígenos solubles (C3, C4, transferrina, etc.) presentes en muestras biológicas. La técnica se basa en la difusión de la muestra conteniendo el antígeno a medir (inmunoglobulinas o antígenos solubles) en una matriz semisólida de agar en la que se encuentra disuelto el Ac específico.

Método de referencia: Morrill *et al.*, (2014)

Procedimiento:

La muestra biológica se introduce en los orificios cilíndricos excavados en el agar y a medida que el antígeno difunde en forma radial, se alcanza la relación Ag-Ac que permite la formación precipitados visibles.

Una vez finalizada la difusión se mide el radio (R) de los precipitados que es proporcional a la concentración de antígeno (C).

La concentración de proteína en la muestra biológica (Cx) se calcula realizando una curva de calibración utilizando muestras patrones de concentración conocida.

