

Doctorado en Ciencia Animal

Tesis

Identificación y caracterización bacteriológica y molecular de cepas de *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* en productos lácteos y agua

Por: Karina Cirone

Director: Dr. Fernando Paolicchi
Co-Directora: Dra. María Cristina Jorge

Facultad de Ciencias Veterinarias
U.N.C.P.B.A

Miembros del Jurado:

Dra. Isabel Kantor
Dr. Ángel Cataldi

DEDICATORIA

A mi hija Catalina.

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar quiero agradecer a mi Director, el Dr. Fernando Paolicchi, por permitirme realizar este posgrado y brindarme la oportunidad trabajar a su lado. A mi Co-Directora, la Dra. María Cristina Jorge, por su apoyo incondicional durante toda mi carrera y por su minuciosa discusión y lectura de este manuscrito.

Al Dr. Ramón Juste por su contribución en el análisis de los resultados.

Al Dr. Martín Zumárraga por su colaboración y asesoramiento con las tareas de biología molecular.

A las Dras. Silvia Mundo y Liliana Gilardoni por su colaboración y asesoramiento con las técnicas de extracción de ADN mediante perlas inmunomagnéticas.

Al Dr. Ernesto Späth por su colaboración en el diseño de los muestreos.

A mis amigos y compañeros de oficina Andrea, Alejandra, Yossi y Luciana por su apoyo y paciencia constantes. A mis amigos y compañeros que no integran la oficina pero están día a día, Jorgelina, Pato, Lalo, Ana Rita, Mónica y Quique.

A Claudia y Laura por su participación activa en cada uno de los ensayos. A Jorgelina, Rosana, Paula, Alejandra, Abel y Cristian por colaboración con las tareas de campo y laboratorio.

A los integrantes de la de Cátedra de Microbiología, Yolanda, Claudia, Facundo y Erika.

Quiero agradecer especialmente a mis padres y hermanos, por estar siempre presentes y ayudarme en todo momento para que yo pudiera realizar este posgrado.

A Liliana Antonacci por su amistad incondicional y por su sostén constante cada vez que lo necesité para avanzar.

A mis amigos, Celeste, Sandra, Lorena, Romina, Marianela, Sebastián, Santiago, Guadalupe, Hernán, José, Diego, Jonatan, por escucharme e incentivarme a cada momento.

Y a los tesisistas que pasaron por el laboratorio y colaboraron conmigo de alguna forma u otra, Ernesto, Sol, Ainara y Brenda.

Gracias a todos por estar presentes en esta importante etapa de mi vida.

RESUMEN

La paratuberculosis (PTBC) o enfermedad de Johne es una enteritis crónica producida por *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (MAP) que afecta a bovinos y otras especies. MAP ha sido vinculado en humanos a una inflamación crónica del intestino, denominada enfermedad de Crohn. La leche y sus subproductos sería una de las posibles fuentes de infección y se ha sugerido que esta micobacteria podría resistir las condiciones de pasteurización. El objetivo del trabajo fue identificar MAP en alimentos lácteos crudos y/o procesados y en agua, mediante cultivo y reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para la caracterización de las diferentes cepas aisladas.

Se evaluaron diferentes protocolos para identificar MAP en leche cruda y comercial a través de cultivo y PCR y se determinó el límite de detección de ambas técnicas. Para la identificación de MAP en leche cruda, el protocolo de descontaminación de la muestra con menor límite de detección fue el método que utiliza ácido oxálico al 5% (p/v). Para la identificación de esta micobacteria a través de PCR, la extracción de ADN fue más eficiente utilizando el kit comercial evaluado y las perlas inmunomagnéticas.

Se evaluó la supervivencia de MAP, *E. coli*, and *S. Enteritidis* durante la elaboración y almacenamiento tradicional de yogur. MAP no fue detectado durante la preparación del yogur, pero fue recuperado a los 180 min luego de la inoculación y durante el almacenamiento. Los recuentos de *E. coli* y *S. Enteritidis* aumentaron durante las primeras 24 hs, seguido de un ligero descenso hacia el final del estudio. Estos resultados demostrarían que MAP, *E. coli*, y *S. Enteritidis* resistirían las condiciones ácidas generadas durante la preparación de yogur y las bajas temperaturas del almacenamiento.

También se evaluó la supervivencia de MAP en quesos blandos elaborados con leche bovina artificialmente inoculada con dos niveles diferentes de unidades formadoras de colonias (UFC) de MAP. Esta micobacteria no fue recuperada desde las muestras tomadas en las primeras etapas de la elaboración. Sin embargo, en los quesos elaborados con baja concentración de MAP, fue aislado hasta los 2 días de almacenamiento y en los inoculados con alta concentración de MAP, hasta los 15 días. Esto podría sugerir una adaptación de la bacteria al medio y posterior desarrollo.

Se evaluaron 384 muestras de leche comercializadas en cuenca lechera Mar y Sierras de diferentes marcas comerciales, porcentaje de grasa y tratamientos térmicos. A cada una de las muestras se le realizó cultivo para identificación de MAP y otras micobacterias, recuento de bacterias aerobias mesófilas totales (BAMT) y el test de fosfatasa alcalina (FA) utilizando un kit

comercial. La totalidad de las muestras resultaron negativas al cultivo de micobacterias. Sin embargo, el 1,56% (6/384) de las muestras de leche comercial fueron positivas a PCR para identificación de MAP y el 40,1% (154/384) de las muestras resultaron positivas a la coloración Ziehl Neelsen realizada sobre el barrido de los cultivos negativos. Todas las muestras fueron negativas al test de FA y un 4,95% (19/384) de las muestras, el recuento de BAMT fue superior al límite que establece el Código Alimentario Argentino.

Deberían ser evaluadas las medidas necesarias para evitar la transmisión de MAP y otras micobacterias dentro de establecimiento lecheros y enfatizarse las medidas de control en cuanto a higiene, cadena de frío, etc., tanto en industrias lácteas como en los puntos de venta para asegurar la calidad de los productos que llegan al consumidor.

ABSTRACT

Paratuberculosis (PTBC) or Johne's disease is Chronic Enteritis disease caused by *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (MAP) which affects cattle and other animal species. MAP has been linked to Chronic Inflammatory Bowel disease in humans, named Crohn's disease. Milk and byproducts are possible sources of infection to humans as it was suggested that this mycobacterium could resist pasteurization conditions. The aim of this work was to isolate MAP in water and raw or processed dairy products by bacteriological culture and polymerase chain reaction (PCR) followed by molecular characterization of different strains isolated.

In order to define the minimum concentration limit for detection of MAP in raw and commercial milk different culture and PCR protocols were evaluated. For the identification of MAP in raw milk, the decontamination protocol with lower detection limit was achieved by using oxalic acid 5% (w/v). DNA extraction methods were evaluated using the commercial kit and the immunomagnetic beads for PCR.

During the traditional preparation and storage of yogurt, the survival of MAP, *Escherichia coli*, and *Salmonella* Enteritidis was evaluated. MAP was not detected during the preparation of yogurt, but was recovered 180 min after inoculation and during storage. The live bacterial counts of *E. coli* and *S. Enteritidis* increased during the first 24 hours of refrigerated storage, followed by a slight decrease at the end of the study. These results have demonstrated that MAP, *E. coli* and *S. Enteritidis* resist the acidic conditions generated during the preparation of yogurt and low temperature storage.

MAP survival in cream cheese made from bovine milk artificially inoculated with two different concentrations of MAP was also evaluated. Viable MAP was not recovered from early stages of processing. However, during refrigerated storage, the cheese inoculated with a low concentration of MAP, the bacterium was isolated until the second day of storage while the cheese inoculated with a high concentration of MAP, and it was isolated until the 15th day of storage. These results suggest an initial adaptation of the bacteria to the environment with followed by a growth phase.

Furthermore, 384 samples of commercial milk from Mar y Sierras area, representing different commercial brands, fat percentage and thermal treatments were evaluated. These samples were examined for MAP and other mycobacterium identification, count of total aerobic mesophilic bacteria (TAMB) count and alkaline phosphatase (AP) test using a commercial kit. All samples resulted negative to mycobacterium culture. Despite that, 1.56% (6/384) of the samples were positive to IS900 PCR and 40.1% (154/384) of the samples were positive for the

Ziehl-Neelsen. All the samples were negatives to AP test and 4.95% (19/384) had TAMB counts higher than the limit established by the Argentine Food Code.

In order to ensure the quality of dairy products to consumers, the necessary measures should be assessed to prevent the transmission of MAP and other mycobacteria in dairy establishment. Furthermore, an emphasize should be give to general measures of control such as hygiene, cold chain, etc. in dairy industries and retail stores.

PALABRAS CLAVE

Mycobacterium avium subsp. *paratuberculosis*; leche; yogur; quesos; cultivo; PCR, rodeos lecheros, BAMT, fosfatasa alcalina, agua.

ABREVIATURAS

Ac: anticuerpo

aw: actividad de agua

ADN: ácido desoxiribonucleico

BAMT: bacterias mesófilas aerobias totales

CAA: Código Alimentario Argentino

CTAB: bromuro de hexadeciltrimetilamonio

ELISA: “enzyme linked immunosorbent assay”

ETAs: enfermedades transmitidas por alimentos

FA: fosfatasa alcalina

h: horas

HEYM: Herrold con micobactina, piruvato y antibióticos

HPC: cloruro de hexadecilpiridinio

HTST: alta temperatura corto tiempo

IMB: “immunomagnetic beads”

IgG: inmunoglobulina G

log: logaritmo

M: molar

min: minutos

NaCl: cloruro de sodio

PBS: tampón fosfato salino

pb: pares de bases

PCR: “polimerase chain reaction”

rpm: revoluciones por minuto

SDS: dodecil sulfato de sodio

UAT: ultra alta temperatura

UFC: unidades formadoras de colonias

UP: ultrapasteurizada

ZN: Ziehl Neelsen

ÍNDICE

DEDICATORIA	ii
AGRADECIMIENTOS	iii
RESUMEN	iv
RESUMEN (INGLÉS)	vi
PALABRAS CLAVES Y ABREVIATURAS	viii
ÍNDICE	ix
INTRODUCCIÓN AL TEMA DE TESIS	1
Etiología y métodos de detección	2
Paratuberculosis en los animales	3
Enfermedad de Crohn en humanos	4
MAP en la cadena alimentaria	6
Importancia económica de la producción láctea	6
Leche	7
Quesos	13
Agua	14
Otros alimentos	15
HIPÓTESIS	16
OBJETIVO GENERAL	17
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	17
CAPÍTULO I: Determinación de protocolos de cultivo y PCR para detección de MAP	18
INTRODUCCIÓN	19
DISEÑO EXPERIMENTAL: MATERIALES Y MÉTODOS	23
RESULTADOS	30
DISCUSIÓN	37
CAPÍTULO II: Procesamiento de productos lácteos	40
INTRODUCCIÓN	41
DISEÑO EXPERIMENTAL: MATERIALES Y MÉTODOS	43

RESULTADOS	47
DISCUSIÓN	56
CAPÍTULO III: Análisis de muestras de leche, quesos, yogures y agua	60
INTRODUCCIÓN	61
DISEÑO EXPERIMENTAL: MATERIALES Y MÉTODOS	64
RESULTADOS	69
DISCUSIÓN	78
DISCUSIÓN GENERAL	81
CONCLUSIONES	90
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	92
PUBLICACIONES	112
APÉNDICE	113

INTRODUCCIÓN AL TEMA DE TESIS

La paratuberculosis (PTBC) o enfermedad de Johne es una enfermedad infecciosa producida por *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (MAP) (Manning y Collins, 2010). Este agente etiológico ha sido investigado en un amplio rango de especies domésticas y de ambientes ecológicos de fauna silvestre y parques zoológicos tales como cabras, ciervos blancos, ciervos rojos, alces, muflones, camellos, ovejas, ñus, búfalos y llamas, siendo la especie más estudiada el bovino (Judge *et al.*, 2005; Glawischnig *et al.*, 2006; Moravkova *et al.*, 2008; Fiorentino *et al.*, 2012; Dimarelli-Malli *et al.*, 2013). En éste, la enfermedad se caracteriza por una enteritis crónica, que puede conducir a la muerte del animal afectado. La principal vía de transmisión entre bovinos es la fecal-oral y luego de la ingestión, MAP cruza la barrera de la mucosa para acceder a los macrófagos, causando inflamación crónica del intestino delgado (Collins y Morgan, 1991; Ponnusamy *et al.*, 2013).

La epidemiología está ligada a las características biológicas del microorganismo: lento desarrollo, parasitismo obligado, alta resistencia ambiental, posibilidad de infección congénita y transmisión a través de la leche. La PTBC presenta el mismo patrón epidémico que otras enfermedades infecciosas, la diferencia radica en el curso de la misma, por ello es necesario medir la tasa de prevalencia en el rodeo durante un período de varios años. Es por esta razón que no se observan epidemias (Collins y Morgan, 1991).

Desde 1913 fue sugerida una posible asociación entre MAP y la Enfermedad de Crohn (EC) en humanos cuando se encontraron similitudes patológicas y sintomatológicas entre humanos y animales con Enfermedad de Johne (Sanderson *et al.*, 1992; Hermon-Taylor *et al.*, 1998; Bull *et al.*, 2003; Uzoigwe *et al.*, 2007; Behr y Kapur, 2008). Actualmente, después de 100 años, muchos trabajos de investigación evidencian esta asociación mediante la detección de MAP por PCR y cultivo desde biopsias intestinales o ganglios linfáticos de pacientes con EC, o por detección de la respuesta serológica a antígenos de MAP y también debido a la remisión de la enfermedad tras la aplicación de terapias con antibióticos anti-MAP en este tipo de pacientes (Hermon-Taylor y Bull, 2002)

Una posible vía de transmisión al humano serían los alimentos contaminados, principalmente los lácteos. La mayoría de los estudios realizados enfatizan el rol de la leche fluida como principal vehículo de transmisión ya que la pasteurización no lograría eliminar totalmente las células de MAP viables presentes en el producto. Otros productos lácteos, cárnicos y el agua podrían también transmitir

esta micobacteria al humano pero estos alimentos han sido poco estudiados (Grant, 2006; Patel y Shah, 2011).

Etiología y métodos de detección

Entre la Clase *Actinobacteria* y organismos relacionados se encuentran los pertenecientes al Orden *Corynebacteriales*, subdivididos en distintas familias entre las que se encuentra *Mycobacteriaceae*. MAP se encuentra clasificado dentro de esta última en el género *Mycobacterium*, especie *avium*, subespecie *paratuberculosis* (MaGee y Ward, 2012). Es un bacilo ácido-alcohol resistente a la tinción de Ziehl Neelsen (ZN) y positivo a la de Gram, aerobio facultativo y muy resistente a las condiciones ambientales. Necesita micobactina exógena para su crecimiento *in vitro* principalmente en el aislamiento primario y durante su desarrollo forma pequeñas colonias de 1 a 5 mm, firmes, brillantes, blancas y lisas. MAP es un patógeno obligado, porque solamente se multiplica en el huésped susceptible (Hermon-Taylor, 2001). Es resistente a diferentes condiciones ambientales adversas debido a los componentes lipídicos de su pared celular (ácidos micólicos), los cuales son de importancia también para su identificación. Está estrechamente relacionada con otras bacterias pertenecientes al género y especie *M. avium*, compartiendo algunos determinantes antigénicos y se diferencia de otras especies de micobacterias, que están comunmente en el medio ambiente por la capacidad de causar enfermedad intestinal en el ganado y otras especies animales (Patel y Shah, 2011).

El agente etiológico de la PTBC crece lentamente en medios de cultivo como Herrold (Herrold, 1931), Stonebrink, Löwenstein Jensen, Middlebrook, entre otros (Kalis *et al.*, 2000). Un gran elemento diferenciador de MAP es su dependencia de micobactina (Thorel *et al.*, 1990; Lambrecht y Collins, 1992; Li *et al.*, 2005). La micobactina es un compuesto quelante del hierro que producen casi todas las micobacterias, excepto MAP, y que permite su crecimiento en medios muy pobres en este oligoelemento (Snow, 1970; Thorel *et al.*, 1990; Lambrecht y Collins, 1992; Li *et al.*, 2005).

Existen otros métodos para la detección de MAP como la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) y para su tipificación, como la búsqueda del polimorfismo en la longitud de los fragmentos de restricción (RFLP). Estos análisis se basan en la identificación del segmento de inserción IS900, una secuencia repetida de 14 a 18 veces en su genoma considerada única de MAP (Green *et al.*, 1989).

Existen evidencias de que MAP puede sobrevivir en forma vegetativa como esferoplastos o formas “L” (cells wall deficient) las que no son cultivables por métodos tradicionales requiriendo de medios específicos para su reversión a formas naturales (Whitington *et al.*, 2004).

Paratuberculosis en los animales

En los bovinos, la enfermedad se caracteriza por una enteritis crónica, cuyos signos son: diarrea, pérdida de peso, edema submandibular y desmejoramiento corporal progresivo que conduce eventualmente a la muerte del animal afectado. Se manifiesta a la edad adulta (3 o más años), sobre todo en las proximidades del parto, siendo menos frecuente en animales jóvenes y muy raramente alrededor del año de vida. Existen también portadores asintomáticos considerados como infectados subclínicamente. En los pequeños rumiantes domésticos la PTBC se manifiesta por lo general con debilitamiento, pérdida de peso y ausencia de diarrea (Manning y Collins, 2001).

Los animales que cursan el estadio subclínico, que habitualmente es el de mayor duración, excretan MAP por calostro, leche y heces sin evidenciar signos clínicos. De esta manera transmiten la infección a otros animales susceptibles, particularmente a los terneros. En esta etapa de la enfermedad se observa una disminución de la sensibilidad por debajo del 50% de las técnicas diagnósticas utilizadas corrientemente como con el cultivo de materia fecal y la prueba de ELISA indirecto para la detección de anticuerpos séricos. A fin de mejorar la sensibilidad diagnóstica se desarrollaron técnicas de biología molecular, como PCR, que puede ser aplicada en muestras de materia fecal, leche y tejidos. Sin embargo, la eliminación de MAP por las dos primeras vías es intermitente y con una baja concentración (Gilardoni, 2012).

La OIE inscribe a la PTBC en la lista de enfermedades de declaración obligatoria (OIE, 2010), según el criterio de propagación internacional, importancia socioeconómica y/o sanitaria a nivel nacional, repercusiones en el comercio internacional de animales y por ser una posible zoonosis. Las pérdidas económicas por la PTBC se clasifican en directas, indirectas e inaparentes (Kennedy y Benedictus, 2001). Las pérdidas económicas directas son causadas por la disminución de producción de leche o carne. Mediante estudios realizados en otros países se estimó que la reducción en la producción de leche se aproximaría a un 4% del rendimiento total (Collins *et al.*, 1996). Varios trabajos de investigación han determinado la prevalencia de la PTBC en distintos países la cual se halla entre 3,5 y 70% para los países desarrollados (Cetinkaya *et al.*, 1996; Giese y Ahrens, 2000; Jakobsen *et al.*, 2000; Kennedy y Benedictus, 2001; Streeter *et al.*, 1995; Wells y Wagner, 2000). En USA, además, se determinaron las pérdidas económicas las cuales fueron valuadas en aproximadamente U\$S 200 millones anuales, solo teniendo en cuenta la industria láctea (Ott *et al.*, 1999).

Investigaciones realizadas en INTA, Argentina, estimaron que esta disminución alcanzaría hasta un 19%, y que las pérdidas económicas directas e indirectas en la producción pecuaria se aproximarían

a 22 millones de U\$S para explotaciones de bovinos destinados a carne y hasta 6,3 millones de U\$S para las cuencas lecheras de la provincia de Buenos Aires (Paolicchi *et al.*, 2003). En la zona denominada Cuenca del Río Salado, la seroprevalencia observada se encontró entre 7.2% y 19%, observando que en rodeos lecheros la PTBC es más prevalente y presenta un riesgo de infección mayor (OR=3.9) que en los bovinos para carne (Becker *et al.*, 2005).

Enfermedad de Crohn en humanos

MAP ha sido vinculado a la EC en humanos, un desorden sistemático que causa principalmente una inflamación crónica del intestino. Ha sido definida como una enfermedad de etiología multifactorial, involucrando a infecciones persistentes con MAP, *Listeria sp.*, *E. coli* y otras bacterias, a defectos de la barrera mucosal del intestino o a fenómenos de desregulación del sistema inmune con pérdidas de tolerancia y también asociada a factores genéticos de susceptibilidad individual, siendo por último la combinación de alguno o de todos estos factores asociados para producir la enfermedad en humanos (Bandzar *et al.*, 2013).

Durante el transcurso de esta patología, se produce una inmunodepresión del revestimiento mucosal del intestino lo que provoca síntomas como: diarrea profusa, inflamación de ganglios linfáticos e intestino, depresión inmunológica general y debilitamiento (Hermon-Taylor y Bull, 2002). Otros síntomas asociados a la EC son dolor abdominal, fiebre leve y persistente, poco apetito, pérdida de peso, ruidos abdominales, fatiga, sangrado intestinal y heces fétidas. Se han notificado molestias en la piel, articulaciones, ojos, hígado, retraso en la aparición de la pubertad y problemas de crecimiento y finalmente complicaciones como obstrucción de la pared intestinal, úlceras y fístulas (Garabetyan, 2005).

No existen muchos datos aún sobre la prevalencia nacional de esta enfermedad en los distintos países del mundo. En una región de Estocolmo se realizó un relevamiento de los casos de EC entre los años 1990-2001 y se determinó que la prevalencia en esa zona es de 213 cada 100.000 habitantes, o sea que un 0.2% de la población sufre EC (Lapidus, 2006). En Reino Unido no existen datos oficiales sobre la incidencia de esta enfermedad pero a través de un estudio realizado en el Norte de Inglaterra se estimó que la incidencia sería igual a 8.3/100000 habitantes por año y la prevalencia puntual sería igual a 144.8 cada 100.000 habitantes por año (Hermon-Taylor y Bull, 2002).

Los datos epidemiológicos marcan que en los países más desarrollados (Ej. EEUU) se presentan tasas de EC más elevadas que en Latinoamérica, donde se identifican dos grupos etarios cuyas edades

oscilan entre los 15 y 30 años con un pico a los 24 y otro grupo de afectados adultos cuyo pico está entre los 60 y 65 años (Garabetyan, 2005). La EC afecta 1.4 millones de americanos, de los cuales 140.000 tienen menos de 18 años. Aproximadamente 25% de todos los nuevos casos tienen menos de 20 años de edad y cerca de 30.000 nuevos pacientes son diagnosticados cada año (Bandzar *et al.*, 2013).

Los antecedentes bibliográficos citan que en casos de EC se ha detectado ADN de MAP por medio de PCR en el 90% de los casos estudiados, hibridación *in situ* en el 70% de los casos (Sechi *et al.*, 2001), RT-PCR (RNA) en el 100% de los casos. Por otro lado MAP ha sido cultivada en enfermos de Crohn desde heces, tejido intestinal y de muestras de sangre periférica, pero también fue detectado por cultivo y/o PCR a partir de 9/34 pacientes control o sanos (Bull *et al.*, 2003). El aislamiento de MAP a partir de pacientes sanos fue observado en otros trabajos y es considerado como evidencia de que MAP puede colonizar pacientes sanos no sería el agente causal de la EC (Rossenfeld y Bressler, 2010).

En pacientes humanos con hemofilia, SIDA, linfocitopenia y diarrea profusa, mediante biopsia del colon, de hígado y medula ósea fueron detectados bacilos ácido alcohol resistentes y los análisis por cultivo y PCR resultaron positivos para MAP (Ritcher *et al.*, 2002). También fue informado casos de niños de quienes se logró aislar MAP por cultivo de los linfonodos afectados (Greenstein, 2003). Un hallazgo de importancia clínica es que MAP ha sido cultivado desde la leche materna de dos mujeres que padecían la EC, aislamiento que fuera confirmado por detección de la secuencia de inserción IS900 por PCR (Naser *et al.*, 2000). Finalmente en varios casos de EC, el uso de antibióticos como claritromicina y rifabutina para los cuales MAP es sensible, ha permitido remitir la expresión clínica de la enfermedad (Grant, 2005). Por el contrario, Rossenfeld y Bressler (2010) en su revisión mencionan la aplicación de antibióticos que no mejoran la sintomatología en personas con EC, como evidencia de que MAP no sería el agente causal de esta enfermedad. Actualmente no existe una cura conocida y las investigaciones actuales se centran en controlar los síntomas (Bandzar *et al.*, 2013). La similitud entre la PTBC y la EC respalda la hipótesis de que MAP sería el agente etiológico de la EC, sin embargo, hasta el momento, existen evidencias controversiales para afirmar esta teoría.

Existen dos posibilidades principales que podrían explicar el rol de MAP en la EC: la primera es que esta bacteria es el agente causal de esta enfermedad y la segunda es que MAP no contribuye con la etiología de la EC, pero su presencia es una consecuencia de la inflamación del intestino y por ende de la disminución de la respuesta inmune del huésped (Rossenfeld y Bressler, 2010).

MAP en la cadena alimentaria

Importancia económica de la producción láctea

La leche es un alimento básico en la dieta humana, por lo que la producción de cada país se destina fundamentalmente a satisfacer los requerimientos de consumo interno. Desde comienzos del decenio de 1960, el consumo de leche *per cápita* de los países en desarrollo se ha casi duplicado. Sin embargo, el consumo de leche ha aumentado más lentamente que el de otros productos pecuarios, el consumo de carne se ha más que triplicado y el consumo de huevos se ha quintuplicado (Schaller, 2006).

En nuestro país, a partir de 1991, la mejora del poder adquisitivo explicaría gran parte del significativo aumento del consumo *per cápita* de lácteos, que pasó de 164 litros equivalentes leche fluida/habitante/año en 1990 a 213 litros en 1992. Desde entonces y hasta el año 2000, los crecimientos fueron más moderados. El récord histórico de consumo se registró en 2000 y alcanzó los 231 litros. En 2004 el consumo total de leche y productos lácteos alcanzó, en el mundo, los 83,4 litros equivalentes leche/habitante/año. Según los últimos registros de Ministerio de Agricultura de la Nación, en el 2012, esta cifra fue de 216 litros/habitante/año (Ministerio de Agricultura, Ganadería y Pesca –B.A. – Argentina, 2012).

Según datos de la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO), se estima que en el quinquenio 2000-2004 la producción mundial de los *commodities* lácteos experimentó un crecimiento del 9% para el conjunto de los rubros, entre los que se destacan las alzas del 13% para la leche en polvo entera, del 12% para los quesos de leche de vaca y del 3% para la manteca. En tanto, la leche en polvo descremada cayó un 7%. En 2005 la producción mundial de leche de vaca fue de alrededor de 531.000 millones de litros, lo que representa el 84% de los 630.000 millones de litros que totaliza la leche producida por todas las especies. Los principales productores de leche de vaca fueron: Estados Unidos (80.000 millones de litros), India (38.500 millones de litros) y la Federación Rusa (30.500 millones de litros) (Schaller, 2006).

En los tres últimos decenios, la producción lechera mundial ha aumentado en más del 50 por ciento, pasando de 482 millones de toneladas en 1982 a 754 millones de toneladas en 2012. La India es el mayor productor mundial de leche, con el 16 % de la producción total, seguido por los Estados Unidos de América, China, Pakistán y Brasil. Desde el decenio de 1970, el aumento de la producción lechera se registra en su mayor parte en Asia meridional, que es el principal impulsor del crecimiento de

la producción lechera en el mundo en desarrollo. La producción lechera en África crece más lentamente que en otras regiones en desarrollo debido a la pobreza y, en algunos países, a las condiciones climáticas adversas. Los países con los mayores excedentes de leche son Nueva Zelanda, los Estados Unidos de América, Alemania, Francia, Australia e Irlanda. Los países con los mayores déficits de leche son China, Italia, la Federación de Rusia, México, Argelia e Indonesia (Faye y Konuspayeva, 2012).

En lo que respecta a nuestro país, en el 2004, la producción nacional de leche de vaca alcanzó los 9.169 millones de litros, lo que significó el final de una fase declinante de cuatro años consecutivos tras el récord histórico registrado en 1999 (10.300 millones de litros). En el 2005 la producción nacional de leche se hallaba en el orden de los 9.600 millones de litros, por lo que ocupaba el 16° lugar del ranking mundial de países productores de leche de vaca. Aunque la cantidad de tambos mostró una reducción del 2,4% interanual en promedio para 2005, la producción diaria por tambo arrojó una media 7,5% superior a la de 2004 (Schaller, 2006). En el 2012, la producción anual alcanzó los 11.338 millones de litros y las exportaciones 2.492 millones de litros, a 103 países diferentes del mercado internacional. El principal producto exportado es la leche en polvo (Ministerio de Agricultura, Ganadería y Pesca –B.A. – Argentina, 2012).

Leche

En los últimos años se ha avanzado en la investigación sobre la relación de MAP y la EC, poniendo énfasis en los productos alimenticios como vía de transmisión. Algunas evidencias sugieren que los humanos se podrían infectar vía leche contaminada ya que los animales enfermos excretan las micobacterias acantonadas en la glándula mamaria, aunque existe poca información acerca del número de células de MAP que podrían estar presentes en la misma (Eltholth *et al.*, 2009). Stabel (2001) encontró 1 UFC/mL de leche de animales clínica y subclínicamente infectados, en cambio en Dinamarca (Giese y Arens, 2000) detectaron 100 UFC/mL de leche provenientes de animales con sintomatología clínica. Además, a este número deberían sumarse las bacterias provenientes de la contaminación fecal que toma contacto con los pezones de vacas enfermas ya que las heces de bovinos con PTBC podrían contener más de 10^8 UFC/g (Chiodini y Hermon Taylor, 1993). Pese a estos datos los niveles de contaminación de la leche son desconocidos y podrían encontrarse entre 1 a 250 UFC/mL hasta más de 10^4 UFC/mL (Grant *et al.*, 1996; Pearce *et al.*, 2001).

Actualmente es de considerable interés determinar la eficacia de los tratamientos térmicos usados en la industria láctea para evitar la presencia de células viables de MAP en el producto final y

determinar el tratamiento más efectivo y factible de aplicar en la producción de lácteos que asegure la eliminación de esta micobacteria. El lento crecimiento de MAP en medios de cultivo; la naturaleza hidrofóbica de su superficie celular que provoca el agregado de las bacterias en las superficies de los líquidos o en las paredes de tubos, pipetas, etc.; y su tendencia a formar “*clumps*” o agregados de miles de bacterias que dan lugar a una sola colonia (Klijn *et al.*, 2001), son los principales problemas a los cuales se deben enfrentar los investigadores para realizar los estudios de resistencia al calor, haciendo erráticos los recuentos de bacterias viables (Lund *et al.*, 2002). En estudios de pasteurización de laboratorio con leche inoculada experimentalmente que reportaron supervivencia de MAP fueron criticados por no representar las condiciones que se dan a nivel comercial en cuanto a: número de UFC/mL de MAP presentes en la leche, pérdida del flujo turbulento y volúmenes de leche analizados (Grant, 2006).

Es por ello que la información disponible, proveniente de estudios que simulan la pasteurización de leche artificialmente inoculada, es variada y los resultados están resumidos en las Tablas 1 y 2. La primera muestra los resultados de estudios de pasteurización en laboratorio, mientras que la segunda resume la información obtenida a partir de estudios en plantas piloto o pasteurizadores comerciales a escala.

Observando los resultados de los trabajos mostrados en la Tabla 1 podemos concluir que:

1. en 3/5 trabajos que aplicaron un tratamiento de pasteurización convencional (63°C por 30 min) la disminución de la viabilidad de MAP fue mayor a 5 logaritmos (log), mientras que los dos restantes muestran una disminución de solo 2 a 3 log, lo que no sería suficiente para eliminar completamente esta bacteria. Además se observa que a mayor inóculo mayor es la disminución de viabilidad de esta micobacteria.

2. en 6/10 estudios que aplicaron pasteurización por alta temperatura por corto tiempo (HTST) la reducción de MAP viables fue mayor a 4 log; coincidiendo en 5 de los 6 estudios con la aplicación de flujo laminar en la unidad de pasteurización. En los restantes (leche calentada en baños de agua) la reducción logarítmica fue mucho menor. Este hecho demuestra que el movimiento de partículas presentes en la leche durante el tratamiento podría favorecer la eliminación de MAP.

Stabel *et al.* (1997) describe algunas dificultades al comparar datos obtenidos de varios trabajos de investigación y cuestiona algunas de las metodologías utilizadas en los mismos, pero concluye que la pasteurización HTST disminuiría entre 5 y 6 log la población de MAP viables. Sin embargo, esta conclusión no es compatible con los resultados obtenidos a partir de estudios realizados en plantas

HTST pilotos (Gould *et al.*, 2004). En un estudio reciente realizado en Italia sobre tres plantas procesadoras de leche, estimó a través de un modelo estadístico que una proporción de 0,55% - 0,98% de leche pasteurizada está contaminada con MAP en niveles que van desde 0 a 100 UFC/L de leche y que un 0,04 a 0,11% de leche contiene más de 100 UFC/L de MAP (Serraino *et al.*, 2014).

Las principales conclusiones que pueden extraerse de la información presentada en la Tabla 2 son:

1. aplicando una pasteurización 1 o 2 grados por encima de 72°C (tratamiento HTST) se podría asegurar ausencia de MAP viables en el producto final (Mc Donald *et al.*, 2005, Pearce *et al.*, 2001, Rademarker *et al.*, 2002).
2. una pequeña cantidad de células de MAP podría sobrevivir a la pasteurización HTST si está presente en la leche cruda en alta concentración (10^4 o más UFC/mL de leche) (Gao *et al.*, 2002, Grant *et al.*, 2002a).
3. la aplicación de homogenización durante el proceso de pasteurización HTST reduciría la viabilidad de MAP en gran medida comparado con el mismo tratamiento térmico pero sin homogenización. Esto, sumado al aumento del tiempo de pasteurización hasta 25 segundos en vez de los 15 segundos rutinariamente utilizados, podría eliminar completamente las células de MAP viables (Grant *et al.*, 2005).

Tabla 1: Determinaciones de laboratorio de la resistencia de MAP al calor.
(Gould *et al.*, 2004)

Pasteurización a 63°C por 30 min			Pasteurización a 72°C por 15 seg			Referencia
Inóculo	Reducción decimal	Método de pasteurización empleado	Inóculo	Reducción decimal	Método de pasteurización empleado	
10 ⁴	<2	Tubos de 10mL en baño de agua	10 ⁴	<2	Doble calentamiento con mezcla continua	Chiodini y Hermon-Taylor (1993)
10 ⁶⁻⁷	5-6	Tubos de 5mL en baño de agua	10 ⁶⁻⁷	4.3-6	250 mL calentados en unidad pasteurizadora en batch	Grant <i>et al.</i> (1996)
10 ³⁻⁴	2-3.7		10 ³⁻⁴	2-3.7	250 mL calentados en unidad pasteurizadora en batch	Grant <i>et al.</i> (1999)
			10 ⁵⁻⁶	5.6-6	Unidad pasteurizadora de flujo laminar a escala	Hope <i>et al.</i> (1996)
			10 ⁵	5	Unidad pasteurizadora de flujo laminar a escala	Stabel <i>et al.</i> (1997)
			10 ⁶⁻⁷	0.5-3	Unidad pasteurizadora de flujo laminar a escala	Stabel <i>et al.</i> (1997)
			10 ^{5.5-6}	>4.5-5	Unidad pasteurizadora de flujo laminar a escala	Stabel <i>et al.</i> (1997)
10 ⁵⁻⁶	>6	0.1mL de inóculo agregados a 1.5mL de leche precalentada en tubos inmersos en baño de agua	10 ⁵⁻⁶	1-2	0.1mL de inóculo agregados a 1.5mL de leche precalentada en tubos inmersos en baño de agua	Sung y Collins (1998)
10 ⁶⁻⁷	>6	Tubos capilares de 0.05mL en baño de agua	10 ⁶⁻⁷	4	Tubos capilares de 0.05mL en baño de agua	Keswani y Frank (1998)
			10 ⁶	>6	Unidad pasteurizadora piloto de flujo laminar	Rademaker <i>et al.</i> (2002)
10 ⁵⁻⁶	>6	Tubos capilares de 0.05mL en baño de agua	10 ⁵⁻⁶	>6	Tubos capilares de 0.05mL en baño de agua	Van Brandt <i>et al.</i> (2011b)
10 ⁴⁻⁵			10 ⁴⁻⁵			

Tabla 2: Inactivación de MAP en plantas pilotos y pasteurizadores comerciales.

Sistema de calentamiento	Inóculo	Proceso	Resultado	Referencia
HTST escala piloto	3 Cepas bovinas ($0.7-13 \times 10^{13}$ UFC/mL)	15 s a 63, 66, 69 y 72°C	No hubo viabilidad a 72°C, pero si hubo a 69°C	Pearce <i>et al.</i> (2001)
HTST escala piloto	5 Cepas bovinas	18 s a 68.1-79.1°C 15-30 s a 72-75°C 18-19 s a 80-90°C 40-60 s a 62-90°C	Viabilidad en 77/282 muestras Viabilidad en 45/45 muestras Viabilidad en 53/53 muestras Viabilidad en 48/48 muestras	Hammer <i>et al.</i> (2002)
Pasteurizador de escala comercial	Leche naturalmente infectada con MAP (10^1 a 10^5 UFC/mL)	15 o 25 s a 73°C	Viabilidad en 8% muestras (15s /73°C no homogenizadas) Viabilidad en 2% muestras (15s /73°C homogenizadas) Viabilidad en 12% muestras (25s /73°C no homogenizadas) Viabilidad en 6% muestras (25s /73°C homogenizadas)	Grant <i>et al.</i> (2002a)
HTST planta piloto	Leche cruda y UHT Inoculada (1×10^6 UFC/mL)	10, 20 y 30 s a 68, 72 y 78°C	Mortalidad de 2 log (68°C /10 seg) Mortalidad de 4 log (68°C /20 seg)	Rademarker <i>et al.</i> (2002)
HTST planta piloto	10^3 , 10^5 y 10^7 UFC/mL	30 min a 63°C 15 s a 72°C	No hubo viabilidad Viabilidad en 2/17 muestras	Gao <i>et al.</i> (2002)
HTST planta piloto	10^3-10^4 UFC/mL	15, 20 y 25 s a 72, 75 y 78°C	Viabilidad en 3/20 muestras. Mortalidad de 5 log en 17/20 muestras	Mc Donald <i>et al.</i> (2005)
HTST planta piloto	10^1 a 10^5 UFC/mL	15, 25 y 60 s a 72,5 a 84.5°C con y sin homogenización	Viabilidad en 13/144 muestras no homogenizadas Viabilidad en 14/528 homogeneizadas	Grant <i>et al.</i> (2005)

Otras nuevas tecnologías de inactivación de microorganismos han sido probadas para evaluar la resistencia de MAP. Rowan *et al.* (2005) probaron distintas temperaturas en combinación con pulsos eléctricos sobre leche y agua inoculadas con MAP logrando un gran nivel de reducción de células viables con el aumento de la temperatura de calentamiento. La aplicación de alta presión hidrostática es una técnica moderna que se está utilizando actualmente para la inactivación de microorganismos indeseables que pueden estar presentes en alimentos. En un trabajo publicado recientemente esta tecnología fue probada para la inactivación de MAP en muestras de leche esterilizada artificialmente inoculadas con dos cepas distintas, observándose que la reducción de la viabilidad de MAP se incrementó conforme al aumento en el nivel de presión (López-Pedemonte *et al.*, 2006).

Algunos estudios se han centrado en detectar la presencia de MAP viables en leche comercial resultando positivas entre el 1.6 al 2.8% de las muestras. En el Reino Unido esta micobacteria ha sido detectada en un 2% de muestras de leche pasteurizada comercial y en un 6.7% en muestras de leche cruda sometida a pasteurización experimental a 72°C por 15 o 25 segundos (Grant *et al.*, 2002b). También en los estados de California, Minnesota y Wisconsin, Estados Unidos, fueron encontrados organismos viables de MAP en un bajo número de envases de leche comercial pasteurizada. En este caso, de 702 muestras analizadas un 2.8% contenían MAP viables (Ellingson *et al.*, 2005). En República Checa, Ayele *et al.* (2005) analizaron muestras de leche pasteurizada comercializada en distintos puntos de venta de ese país. MAP fue cultivado a partir de 4 (1.6%) de 244 muestras. En Brasil, fueron analizadas 37 muestras de leche pasteurizada comercial tomadas a partir de comercios del estado de Mina Gerais, aislándose MAP a partir de una de ellas (Carvalho *et al.*, 2012). En India, la presencia de MAP fue evaluada en 43 muestras de leche comercializada tanto cruda como pasteurizada, aislándose esta bacteria a partir de un 44% de leche cruda y un 67% de leche pasteurizada (Shankar *et al.*, 2010). En este último caso, el alto porcentaje de aislamiento de MAP a partir de leche cruda y pasteurizada, refleja una deficiente situación sanitaria general, tanto de control de esta enfermedad como así también de los procesamientos a los cuales está sometida la leche para elaboración de productos derivados.

Estos resultados indican que este patógeno es capaz de sobrevivir en ocasiones la pasteurización comercial. En 7 países europeos fueron analizadas mediante PCR muestras de leche en polvo, resultando positivas un 49% de ellas, y solo una a partir de cultivo (Hruska *et al.*, 2005). En Argentina, se realizó un trabajo donde se analizaron 70 muestras de leche fluida comercial

sometida a distintos tratamientos térmicos. En este estudio se logró el aislamiento de dos cepas de MAP a partir de leche (2.86%) por cultivo y ambas confirmadas por PCR IS900, cepas que demostraron pertenecer al patrón genotípico “A” mediante RFLP, un patrón ya conocido por ser el más prevalente de los aislamientos en Argentina tanto en bovinos como en ciervos y ser similar al C17 europeo (Paolicchi *et al.*, 2012; Moreira *et al.*, 1999).

Quesos

Otros productos lácteos también podrían estar contaminados con MAP, especialmente aquellos elaborados con leche cruda como los quesos de oveja o cabra. En quesos, el bajo pH y la concentración de sal son los dos factores más importantes que contribuyen a la inactivación de patógenos durante el proceso de maduración. Collins y Sung (2000) estudiaron el efecto de tres factores (pH, concentración de sal y tratamiento térmico) en la producción de quesos sobre la viabilidad de MAP, determinando que el calentamiento y el pH bajo afectan la viabilidad de este patógeno, sin embargo, la concentración de sal no fue correlacionada con su muerte. Otras investigaciones realizadas en quesos duros y semiduros elaborados con leche cruda artificialmente contaminada encontraron que los recuentos de MAP decrecieron lentamente durante la maduración y relacionaron la muerte del bacilo con la temperatura aplicada durante la elaboración y el descenso del pH durante la maduración (Spahr y Schafroth, 2001). Badr (2011) evaluó el efecto de la radiación sobre micobacterias presentes en quesos elaborados con leche inoculada artificialmente con MAP, *M. bovis* y *M. tuberculosis*. En este trabajo observó en los quesos utilizados como control que en la cuajada se retiene la mayor cantidad de micobacterias y que los recuentos no disminuyen durante el almacenamiento refrigerado. Por otro lado, estas micobacterias resultaron sensibles a la radiación aplicada ya que no fueron detectadas en los quesos irradiados.

Otros estudios demuestran que la población de micobacterias puede concentrarse durante la producción de quesos y que MAP puede sobrevivir al proceso de maduración de este producto por más de 27 semanas (Donaghy *et al.*, 2004). Un estudio realizado por nuestro grupo demostró que el agente etiológico de la PTBC puede sobrevivir en quesos elaborados con leche bovina hasta los 45 días de maduración y en los quesos elaborados con leche de origen caprino por más de 60 días (Cirone, 2006). Igualmente fueron estudiados los efectos del pH durante la maduración de estos

quesos hallando una correlación positiva entre este factor y la viabilidad de la micobacteria en casos de quesos elaborados con leche caprina.

Ikonomopoulos *et al.* (2005) investigaron la presencia de MAP en distintos tipos de quesos comercializados en Grecia y República Checa y encontraron que un 31.7% y un 3.6% de las muestras testeadas fueron positivas por PCR y cultivo respectivamente. Un dato interesante es que pudieron correlacionar el mayor porcentaje de positividad con los quesos que tenían menor concentración de NaCl (<2%). Un total de 98 muestras de quesos comercializados en Wisconsin (USA) fueron analizadas para identificación de MAP. No se detectó MAP viables en ninguna de las muestras pero un 5% fueron positivas a PCR (Clark *et al.*, 2006).

En un estudio realizado en Suiza se tomaron muestras de distintos tipos de quesos directamente desde los comercios. No se obtuvieron colonias viables de MAP por la técnica de cultivo, sin embargo, de un total de 143 muestras solo 6 (4,2%) resultaron positivas a PCR en Tiempo Real, por consiguiente la presencia de MAP viables no fue confirmada (Stephan *et al.*, 2007). Botsaris *et al.*, (2010) analizaron 42 muestras de queso de diferentes tipos detectando ADN de MAP en 7 de ellas, pero no lograron aislar ni detectar MAP viables por PCR Phage en ninguna de ellas. En Brasil, se estudiaron 30 muestras de queso artesanal de una variedad semidura denominada Coalho, comercializados en el Noreste de ese país. Se detectó ADN de MAP en un 10% de las muestras por PCR. Y además esta micobacteria fue aislada en una de las muestras. Según los resultados observados no fue posible confirmar si la contaminación proviene de la leche cruda o de una inadecuada manipulación durante los procesos de elaboración de este tipo de quesos (Farías *et al.*, 2014). El aislamiento de MAP a partir de quesos comerciales, si bien se dio en baja frecuencia, indica que estos productos podrían ser otra fuente de exposición del humano a MAP.

Agua

El agua también representa un potencial vehículo de transmisión de MAP al ser humano. El ganado bovino enfermo con PTBC puede excretar MAP en su materia fecal contaminando el ambiente, pudiendo llegar hasta aguas superficiales u otras fuentes de agua de consumo humano. Esta micobacteria es muy resistente a la purificación con cloro, bajas temperaturas e incremento del pH, condiciones que podrían encontrarse en los sistemas de suministro de agua potable. En el Reino Unido encontraron que el tratamiento del agua con cloro solo reduce en 2 log la población de MAP viables (Whan *et al.*, 2002). Además, MAP fue encontrado en fuentes de agua potable de grandes

ciudades pertenecientes a países industrializados. En Estados Unidos se comprobó que durante los tratamientos rutinarios realizados al agua de consumo MAP sobrevive a concentraciones mayores que 2 ppm de cloro (Greenstein, 2003).

Varios estudios han evaluado la presencia de MAP en los cursos de agua superficiales a donde podrían llegar los desechos de los animales enfermos presentes en la zona. En Reino Unido detectaron mediante PCR y cultivo la presencia de MAP en un 7,8% de muestras de agua en el Norte de Irlanda (Whan, 2004). En un reciente estudio donde se tomaron muestras del río Taff, Gales, se demostró que un 32.3% de las muestras fueron positivas a MAP por PCR. Este hallazgo fue positivamente correlacionado con la alta incidencia de la EC en Cardiff, una de las ciudades ubicadas en las márgenes del río Taff (Pickup *et al.*, 2005). En un trabajo donde se tomaron muestras del lago Neagh ubicado al norte de Irlanda, se detectaron un 29% de muestras positivas a MAP por PCR, y sólo en una de las muestras fue detectar esta micobacteria viable por cultivo (Aboagye y Rowe, 2011).

Otras micobacterias pueden también contaminar el agua ya que son mucho más tolerantes a los cambios de pH, temperatura y cloración que otras bacterias patógenas dificultando su eliminación (Hall-Stoodley *et al.*, 1999; Le Dantec *et al.*, 2002). Estudios realizados por Lehtola *et al.*, (2006) demuestran que la capacidad de estas bacterias de producir biofilms lo cual aumentaría su supervivencia en sistemas de distribución de agua. Muchas de las MNT no sólo sobreviven en agua por períodos largos de tiempo, sino que también pueden reproducirse en ese ambiente (Kazda *et al.*, 2009; Falkinham, 2010).

Otros alimentos

Otras fuentes de infección alimenticia como carnes, vegetales u otros productos lácteos distintos a los mencionados aún no han sido bien investigadas, a pesar de que la carne podría ser un alimento de bajo riesgo para la contaminación al humano con cepas de MAP. En Argentina, en un trabajo realizado por nuestro grupo de investigación, se aisló MAP a partir de muestras de hígado y tejido muscular de cabras con antecedentes de PTBC, lo cual sugiere la diseminación sistémica en animales infectados. Esto implica que los humanos están expuestos a este patógeno al consumir hígado o cortes de carne caprina (Vechiarelli *et al.*, 2010).

HIPÓTESIS

- La adaptación de las metodologías de cultivo y moleculares permiten la detección de cepas autóctonas de MAP en productos lácteos y agua.
- Los procesos de elaboración a los cuales son sometidos los productos lácteos no son efectivos para eliminar la presencia de MAP viables.

OBJETIVO GENERAL

Identificar *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (MAP) en alimentos lácteos crudos y/o procesados y en agua, mediante cultivo y PCR para la caracterización de las diferentes cepas aisladas.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ✓ Determinar el protocolo más adecuado para identificar MAP en leche cruda y comercial a través de cultivo.
- ✓ Establecer el límite de detección de la técnica de PCR en comparación con los métodos de cultivo.
- ✓ Evaluar la supervivencia de MAP, durante la elaboración y almacenamiento tradicional de yogur y de quesos blandos elaborados con leche bovina.
- ✓ Evaluar el comportamiento y viabilidad de MAP en yogur frente a la presencia de otras bacterias como *E. coli*, and *S. Enteritidis*.
- ✓ Identificar la presencia de MAP y otras micobacterias en leche, yogures y quesos comerciales.
- ✓ Evaluar la calidad de leche comercial a través de las técnicas de recuento de BAMT y prueba de FA.
- ✓ Identificar MAP y otras micobacterias en leche cruda, filtro de tanque de enfriado y agua de bebederos de establecimientos lecheros.

CAPÍTULO I

Determinación de protocolos de cultivo y PCR para detección de MAP

INTRODUCCIÓN

La técnica de cultivo y aislamiento de *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (MAP) a partir de cualquier tipo de muestra es considerada como estándar de oro o método de referencia para la detección de esta micobacteria. Debido a las deficiencias en las metodologías actuales para el aislamiento de MAP a partir de muestras de leche, no es posible determinar exactamente la cantidad de células viables presentes en este tipo de muestras infectadas naturalmente (Slana *et al.*, 2008). Stabel (2001) identificó 1 UFC/mL de leche de animales clínicamente y subclínicamente infectados, mientras que Giese y Arens (2000) detectaron menos de 100 UFC/mL de leche provenientes de animales con sintomatología clínica. Por otro lado, la materia fecal que contamina los pezones adiciona micobacterias al recuento ya que podría contener más de 10^8 UFC/g (Chiodini y Hermon Taylor, 1993). Sin embargo, los niveles reales de contaminación de la leche con MAP son desconocidos y podrían encontrarse entre 1 UFC/mL a 250 UFC/mL hasta más de 10^4 UFC/mL (Grant *et al.*, 1996; Pearce *et al.*, 2001).

El cultivo de MAP tiene muchas desventajas como el largo período de desarrollo de las colonias, el tiempo que toma el procesamiento de las muestras, las dificultades en el control de la contaminación y la necesidad de almacenamiento de los especímenes para volver a procesarlos (Motiwala *et al.*, 2005). El aislamiento de MAP a partir de muestras de leche presenta además otras dificultades debido a que este microorganismo es de lento crecimiento en comparación con la flora microbiana contaminante y el bajo número de MAP viables que puede estar presente. El correcto aislamiento depende principalmente de la optimización de la etapa de descontaminación y de la acertada elección de la sustancia descontaminante, así como también del protocolo utilizado para asegurar la recuperación máxima de células de MAP presentes en la muestra (Dundee *et al.*, 2001). Es por eso que los estudios realizados mediante esta técnica inevitablemente subestiman la verdadera prevalencia de este microorganismo (O'Reilly *et al.*, 2004).

El primer paso en el procesamiento de muestras de leche para cultivo es la centrifugación. Las condiciones (volumen, tiempo y fuerza relativa del centrifugado) utilizadas en los diferentes trabajos de investigación publicados son variadas. Kantor (1976) aisló distintas especies de micobacterias, entre ellas 2 cepas de *M. bovis*, a partir del sedimento de leche producto de la centrifugación industrial obtenido de una planta pasteurizadora de leche. Grant *et al.* (1998) observó que luego del centrifugado, el 69,4% de las células de MAP se pueden encontrar en el *pellet*. Otros trabajos han

demostrado que gran parte de las micobacterias presentes en la leche pueden encontrarse en la fase grasa que se separa y permanece en la parte superior del tubo (Gao *et al.*, 2009).

Luego del centrifugado, el *pellet* y/o la fase grasa debe ser descontaminada químicamente para eliminar la flora contaminante. Para esta fase de descontaminación se han usado sustancias tales como compuestos corrosivos que incluso disminuían la viabilidad de las micobacterias (Merkal *et al.*, 1964), agentes tensioactivos como el cloruro de benzalconio (Merkal *et al.*, 1964,1973; Lagadic *et al.*, 1983) y el cloruro de hexadecilpiridinium, (HPC) (Juste *et al.*, 1991b; Merkal, 1984; Stabel *et al.*, 1997; Whipple *et al.*, 1992), ácido oxálico (Saxegaarf, 1985; Thomas, 1983) y ácido oxálico en combinación con hidróxido sódico (Jones y Kay, 1996). Actualmente el HPC y el ácido oxálico son los descontaminantes más usados siendo el HPC el que tiene mejores propiedades descontaminantes y un menor efecto negativo sobre MAP (Juste *et al.*, 1991; Merkal, 1984; Stabel *et al.*, 1997; Whipple *et al.*, 1992). Dundee *et al* (2001) comparó cuatro protocolos de descontaminación en leche y demostró que el procedimiento con 0.75% p/v de HPC durante 5 horas fue el más efectivo para reducir el crecimiento de otras bacterias y para la recuperación de MAP en cultivo.

Actualmente las combinaciones empleadas (descontaminante - medio de cultivo) para el protocolo convencional de cultivo se basan principalmente en el uso de ácido oxálico e hidróxido sódico con el medio de cultivo Löwenstein-Jensen, y el protocolo que emplea HPC con el medio Herrold con yema de huevo y micobactina (HEYM) (de Juan Ferré, 2005). Este último es el medio de cultivo más utilizado para el aislamiento de MAP, con el agregado de antibióticos. En pocos casos se utiliza el sistema BACTEC con adición de una mezcla comercial de antibióticos denominada PANTA.

La identificación de MAP por cultivo de leche cruda tiene baja sensibilidad (16%-37%) por la baja cantidad de células excretada en ese medio (Sweeney *et al.*, 1992a; Dundee *et al.*, 2001; Grant y Rowe, 2004; Gao *et al.*, 2005), por las desventajas propias del cultivo y por la dificultad que proporciona la grasa láctea en la siembra y posterior identificación de las colonias (Stabel *et al.*, 2002).

Dentro de los métodos basados en técnicas de biología molecular para la detección de MAP se encuentran la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), la PCR en tiempo real y la búsqueda del polimorfismo en la longitud de los fragmentos de restricción (RFLP). Estos análisis se basan en la

identificación del segmento de inserción IS900, una secuencia repetida de 14 a 18 veces en su genoma considerada única de MAP (Green *et al.*, 1989).

El uso de métodos biológicos moleculares para la detección de MAP en la leche y otros tipos de muestras fue posible por el descubrimiento de las secuencias específicas de ADN, en particular IS900 (Green *et al.*, 1989) y F57 (Poupart *et al.*, 1993). La PCR ofrece la ventaja de ser rápida, por lo tanto, no es necesario esperar de 4 a 7 semanas requeridas por el cultivo por el sistema BACTEC o las 12 a 19 semanas requeridas para el cultivo convencional. Además la PCR presenta la ventaja de no requerir pruebas adicionales para confirmar la identidad del organismo detectado en una muestra. Por el contrario, en comparación con el cultivo, la prueba de PCR no puede distinguir entre bacterias viables y no viables en las muestras analizadas y tiene un costo más alto. Además, la extracción de ADN bacteriano a partir de material biológico es difícil debido principalmente a tres factores: a) baja concentración bacteriana en la muestra biológica; b) interferencia de restos celulares; y c) presencia de inhibidores de la PCR. Ocasionalmente, pueden darse resultados falsos positivos debido a la contaminación de las muestras por productos genéticos creados en el laboratorio durante el desarrollo la prueba haciendo necesario el uso de controles negativos apropiados (Zapata Restrepo *et al.*, 2008).

La selección del método adecuado de extracción de ADN micobacteriano es esencial para tener éxito en los pasos siguientes de detección. El método óptimo es diferente para cada tipo de muestra y para cada microorganismo. En general, una variedad de métodos se pueden utilizar para el aislamiento de ADN de diferentes materiales biológicos desde someter a ebullición la muestra en agua destilada, interrupción por perlas de vidrio, sonicación, hasta la utilización de diferentes enzimas y sustancias surfactantes. Sin embargo, la extracción de los ácidos nucleicos en las micobacterias es más difícil que en otros microorganismos, debido a la estructura de la pared celular que las hace resistentes a una gran cantidad de *buffers lisis* (Wards *et al.*, 1995).

La PCR es un método rápido de detección, pero también presenta una baja sensibilidad (23%) por la presencia de sustancias inhibitoras de la reacción normalmente presentes en la leche, como la grasa y el calcio, entre otras (Grant *et al.*, 2000; Khare *et al.*, 2004). Por lo tanto, la elección del método de extracción de ADN es crucial para maximizar su utilidad. Una alternativa para mejorar la sensibilidad tanto de la metodología de cultivo y como la de la PCR es incrementar la concentración específica de MAP en las muestras implementando la técnica de perlas inmunomagnéticas (IMB)

acopladas a Anticuerpos (Ac) específicos antiMAP. Se han utilizado Ac policlonales (Grant *et al.*, 1998; Grant *et al.*, 1999; Khare *et al.*, 2004) ya que al dirigirse a varios antígenos de superficie se evitaba el alto nivel de especificidad de los Ac Monoclonales, pero aumentaba la posibilidad de concentrar microorganismos que comparten antígenos de superficie, obteniendo reacciones cruzadas (Grant *et al.*, 1998). Gilardoni (2012) observó que la sensibilidad y especificidad de IMB-PCR IS900 son superiores a los de las pruebas rutinarias y que permite detectar mayor número de animales infectados, mucho de ellos probablemente sean excretores de MAP en estadíos subclínicos.

Los objetivos del presente capítulo son determinar el protocolo más adecuado para identificar MAP en leche cruda y comercial a través de cultivo y establecer el límite de detección de la técnica de PCR en comparación con los métodos de cultivo.

DISEÑO EXPERIMENTAL: MATERIALES Y MÉTODOS

1. DETERMINACIÓN DE PROTOCOLO DE CULTIVO PARA IDENTIFICACIÓN DE MAP

Leche bovina cruda obtenida desde vacas sanas provenientes de rodeos libres de Tuberculosis tuberculino negativos y de rodeos clínicamente negativos a PTBC y seronegativos al ELISA contra MAP y leche comercial ultra alta temperatura (UAT) fueron inoculadas artificialmente con inóculos de diferentes concentraciones de MAP.

1.1. Leche cruda

1.1.1. Inóculos

1.1.1.1. Alta concentración de MAP

Se prepararon suspensiones de MAP utilizando una cepa genotipificada mediante RFLP como Patrón “A” suspendida en buffer salino pH 7, 0.05% Tween 80 (PBS-T), con una concentración aproximada a 0.5 de la escala Mc Farland (Cruickshank, *et al.* 1975). Se realizaron diluciones seriadas del inóculo original para obtener una concentración aproximada de 10^8 UFC/mL.

1.1.1.2. Baja concentración de MAP

Se prepararon suspensiones de MAP de concentración aproximada a 100 UFC/mL, utilizando la misma cepa descrita en 1.1.1, con el objetivo de simular la contaminación natural de la leche (Giese S y Arens, 2000). Cada suspensión se sembró en placas de Petri conteniendo medio de cultivo sólido agar Middlebrook 7H10 (Difco, USA) con agregado de micobactina y piruvato y también en tubos y placas conteniendo Herrold, con micobactina, piruvato y antibióticos (HEYM) (Paolicchi *et al.*, 2003), con motivo de realizar recuentos y determinar la concentración de MAP en cada uno de los diferentes inóculos.

1.1.2. Inoculación y procesamiento de las muestras

Se colocaron 1.5 mL de cada uno de los inóculos de MAP en un total de 16 muestras de 148.5 mL de leche bovina cruda extraída del tanque de enfriado de un tambo clínica y serológicamente libre de PTBC. Ocho muestras de cada *set* se inocularon artificialmente con alta

concentración y las 8 restantes con baja concentración de MAP como se describió en 1.1.1 y 1.1.2. Las muestras fueron centrifugadas a 9400 rpm durante 15 min a 10°C utilizando una centrífuga refrigerada Sorvall modelo RC5CE (Newtown, USA). Una vez centrifugadas el sobrenadante fue eliminado tanto la capa grasa como el *pellet* fueron procesados por separado.

Fueron ensayados los siguientes protocolos de descontaminación:

A) Sin descontaminación

La muestra fue resuspendida en 60 mL de PBS-T y mantenida a temperatura ambiente (TA) durante 5 h.

B) HPC (0.75%) (Sigma, USA) durante 5 h (Dundee *et al.*, 2001)

La muestra fue resuspendida en 60 mL de HPC (0.75% p/v) y mantenida a TA durante 5 h.

C) HPC (0.75%) durante toda la noche (ON)

La muestra fue resuspendida en 60 mL de HPC y mantenida a TA durante toda la noche.

D) Ácido oxálico (5%) (Tacquet *et al.*, 1967)

La muestra fue resuspendida en 60 mL de ácido oxálico (5% p/v) y mantenida TA durante 10-15 min en estufa a 37°C.

E) Cloruro de Benzalconio (0.3%) (Merkal *et al.*, 1973)

La muestra fue resuspendida en 60 mL de Cloruro de Benzalconio (0.3% p/v) y mantenida a TA durante toda la noche.

F) HPC (1%) durante toda la noche (ON)

La muestra fue resuspendida en 60 mL de HPC (1% p/v) y mantenida a TA durante toda la noche.

G) Cloruro de Benzalconio (0.5%) (Merkal *et al.*, 1973)

La muestra fue resuspendida en 60 mL de Cloruro de Benzalconio (0.5% p/v) y mantenida a TA durante toda la noche.

H) HPC (0.75%) durante 48 h

La muestra fue resuspendida en 60 mL de HPC (0.75% p/v) y mantenida a TA durante 48 h. Luego todas las muestras fueron centrifugadas a 9400 rpm durante 15 minutos. El *pellet* y/o la grasa se resuspendieron en 3 mL de PBS-T.

1.1.3. Siembra

Se tomó 0.1 mL de cada muestra y se colocaron en placas de cultivo conteniendo medio Middlebrook 7H10 (Difco, USA) con micobactina y piruvato y HEYM (Paolicchi *et al.*, 2003) comparando los resultados con la utilización de cada uno de ellos. También se sembraron tubos y placas conteniendo HEYM con y sin antibióticos (Vancomicina 0.01% p/v, Anfotericina B 5% p/v, Ácido Nalidíxico 0.3% p/v y Nistatina 0.01% p/v). Cada muestra se fue sembrada por duplicado. Se incubaron a 37°C durante cuatro meses, observando semanalmente la aparición de colonias sospechosas de MAP, las cuales fueron confirmadas por tinción de ZN, dependencia de micobactina y PCR. Los recuentos de micobacterias se expresaron en UFC/mL de leche. Los cálculos para determinar las UFC/mL se realizaron utilizando la siguiente fórmula teniendo en cuenta que el *pellet* fue resuspendido en 2 mL de PBS y que el volumen sembrado en cada medio de cultivo fue de 100µL:

$$\text{FÓRMULA: } \underline{N \times 2} = \text{UFC de MAP/mL de leche}$$

15

N: promedio de las UFC de MAP recuperadas desde ambas repeticiones de cada cultivo.

2 y 15: Surgen de los volúmenes utilizados para resuspender el *pellet* y de la cantidad de leche centrifugada.

1.2. Leche pasteurizada

1.2.1. Inóculos

Se prepararon suspensiones de MAP como se describe en 1.1.1.1 para obtener una concentración aproximada de entre 10^6 y 10^8 UFC/mL.

1.2.2. Inoculación y procesamiento de las muestras

Se colocaron 1.5 mL de cada uno de los inóculos de MAP en un total de 16 muestras de 148.5 mL de leche comercial sometida a distintos tratamientos térmicos. Ocho muestras de cada *set* se inocularon artificialmente con 10^8 UFC/mL y las 8 restantes con 10^6 UFC/mL. Las muestras fueron centrifugadas a 9400 rpm durante 15 min a 10°C utilizando una centrífuga refrigerada Sorvall modelo RC5CE (Newtown, USA).

Fue ensayado el protocolo de descontaminación determinado como más eficiente para leche cruda (método D) en comparación con muestras sin descontaminación (método A).

1.3. Límite de detección

1.3.1. Preparación del inóculo

Se tomó una cepa de MAP perteneciente a la colección del laboratorio de Bacteriología de la Unidad Integrada Balcarce, aislada a partir de materia fecal de bovinos, denominada Santo Domingo 381, Patrón genotípico por RFLP "A". La cepa se tomó en crecimiento exponencial y se preparó una suspensión de bacterias en 10 mL de PBS de concentración aproximada a 0.5 en la escala McFarland. Se realizaron diluciones seriadas al décimo hasta lograr una concentración igual a 10 UFC/mL y se sembraron 120 µL de cada dilución en placas de Petri conteniendo HEYM con antibióticos.

1.3.2. Inoculación y procesamiento de las muestras

Se tomaron 2 L de leche del tanque del tambo de la EEA INTA Balcarce del ordeño de la mañana y se fraccionaron en 16 tubos de centrifuga conteniendo 148.5 mL cada uno (8 para cada dilución por duplicado para decontaminar por 2 métodos diferentes). También se tomaron 2 envases de 1 L de leche UAT y se fraccionaron en 8 tubos de centrifuga conteniendo 148.5 mL. Se agregó a cada muestra 1.5 mL de la dilución del inóculo correspondiente (10^8 UFC/mL a 10^2 UFC/mL). Una de las muestras de cada tanda de 8 se utilizó como control sin inocular. Se procedió de la forma descrita en 1.1.3 y se sembró como se describe en 1.1.4.

2. DETERMINACIÓN DE PROTOCOLO DE PCR PARA IDENTIFICACIÓN DE MAP Y OTRAS MICOBACTERIAS

Se probaron tres métodos con diferentes protocolos de extracción de ADN, a partir de muestras inoculadas como se describió en el apartado 1.1.3 utilizando las concentraciones entre 10^0 a 10^8 UFC/mL para obtener el límite de detección de cada una de las técnicas.

2.1. Método de extracción de ADN por fenol

Se utilizó el método descrito por van Embden *et al.* (1992) y Zumárraga *et al.* (2005) con modificaciones para la extracción de ADN a partir de micobacterias.

2.1.1. Extracción de ADN a partir de colonias de MAP

Se transfirió una o dos colonias de MAP a 400 μ L agua bidestilada y la suspensión se llevó a 100°C durante 30 minutos. Se agregó 50 μ L de lisozima (10mg/mL) (Sigma, USA) y se incubó a 37°C toda la noche. Se agregó 75 μ L de SDS/proteinasa K (10 mg/mL) (Sigma, USA) y se incubó durante 10 minutos a 65°C. Se agregó 100 μ L de NaCl 5 M y 100 μ L de solución de CTAB/NaCl (Sigma, USA) llevada previamente a 65°C y se incubó 10 min a esta temperatura. Se agregó 750 μ L de alcohol cloroformo/isoamílico (24:1) y se centrifugó a temperatura ambiente por 30 min a 9000 rpm. Para precipitar el ADN se agregó 0.6 volúmenes de isopropanol o etanol acetato y se conservó a -20°C durante toda la noche. Se centrifugó durante 30 min a 9000 rpm y se descartó el sobrenadante dejando 20 μ L de suspensión por encima del *pellet*. Se resuspendió el *pellet* en 1 mL de etanol 70%. Se centrifugó nuevamente durante 15 min a 9000 rpm y se descartó el sobrenadante dejando 20 μ L de suspensión aproximadamente por encima del *pellet*. Finalmente se centrifugó durante 5 min a 9000 rpm y se descartó la suspensión restante con ayuda de una micropipeta. Se secó el pellet a 65°C y se resuspendió 20 μ L de agua bidestilada.

2.1.2. Extracción de ADN a partir de leche

Se centrifugaron 150 mL de leche inoculada con distintas concentraciones de MAP durante 30 minutos a 3000 rpm y se calentó la muestra durante 30 minutos a 100°C. Se continuó de la misma forma que para extracción de ADN a partir de cepas.

2.2. Método de extracción de ADN utilizando perlas inmunomagnéticas (IMB)

Se utilizó la técnica descrita por Gilardoni (2012).

2.2.1. Preparación del Anticuerpo

Se emplearon perlas metálicas cubiertas con anticuerpos anti-MAP (IMB Goat Anti-Mouse IgG Magnetic Beads) (England, BioLabs, Inc., #S1431S, USA) con una concentración de 3,65 x

10^{10} IMB/mL, con capacidad adhesiva de 1 mg/5 μ g de IgG murina. La suspensión de IMB fue homogeneizada por suave y constante agitación en un agitador orbital termostático (Modelo E24, New Brunswick Scientific) a 4°C durante 1 h a 10 μ L de IMB homogeneizada ($3,65 \times 10^8$) se adicionó 10 μ g/ μ L de Anticuerpo Policlonal-antiMAP. Se mantuvo en suave y constante agitación a 4°C por 1 h. Posteriormente, se colocó cada suspensión en una gradilla magnética durante 10 min sin agitación. De esta manera se obtiene el complejo IMB-Ac adherido a las paredes del criotubo (precipitado) y un sobrenadante, que fue desechado. Se realizaron tres lavados con PBS, utilizando la misma metodología de separación. El precipitado obtenido (IMB acopladas a los diferentes Ac) fue resuspendido en 100 μ L de PBS.

2.2.2. Extracción de ADN a partir de leche

Las muestras de leche inoculadas con MAP fueron homogeneizadas y mantenidas a 50°C por 15 min. Luego se le agregó a cada muestra 10 μ L del complejo IMB-Ac y se procedió de la forma descrita en 2.2.1.

2.3. Método de extracción de ADN mediante Kit comercial

Se utilizó el kit QIAamp™ DNA blood Mini Kit (Qiagen AG, Basel, Switzerland), según las indicaciones del fabricante: Se calentó a 100°C durante 30 minutos y se agregó 20 μ L de proteinasa K. Se agregó 200 μ L de Buffer AL y se mezcló hasta obtener una mezcla homogénea. Se incubó a 56°C durante 10 minutos. Se agregó 200 μ L de etanol (100%) y se mezcló. Se colocó la mezcla en la columna de 2 mL y se centrifugó a 8000 rpm durante 1 minuto. Se descartó la porción recogida en el tubo colector. Se colocó la columna en un nuevo tubo de 2 mL y se agregó 500 μ L de buffer AW1. Se centrifugó a 8000 rpm durante 1 min y se descartó lo que fluyó en el tubo colector. Se repitió el paso anterior pero agregando 500 μ L de buffer AW2. Se centrifugó a 12000 rpm durante 6 min. Se retiró la columna cuidadosamente evitando que tome contacto con el líquido. Se centrifugó nuevamente a 12000 rpm durante 1 min. Se transfirió la columna a un nuevo tubo de 2 mL y se agregó 200 μ L de buffer AE. Se incubó 5 min a temperatura ambiente y se centrifugó a 8000 rpm durante 1 min.

2.4. Amplificación

Los ADN extraídos por las tres técnicas descritas fueron amplificados de la siguiente manera. La preparación de la mezcla consistió en: 10 μL de buffer green (Promega, USA), 4 μL de Dntp's (2,5 mM c/u) (ABGene, USA), 1 μL *Primer Dir C* (GATCGGAACGTCGGCTGGTCAGG), 1 μL *Primer Rev C* (GATCGCCTTGTCATCGCTGCCG) (Collins *et al.*, 1993), 0.3 μL *Taq* polimerasa, 28.7 μL de agua y 5 μL del ADN de la muestra, llegando a un volumen final de 50 μL . Las muestras fueron sometidas a ciclos de temperatura utilizando la técnica *touch down* (Zumarraga *et al.*, 2005) de la siguiente manera: desnaturalización inicial a 96°C durante 3 min, seguido de 10 ciclos con temperaturas de 96°C, 1 min; el pegado de los *primers* a 72°C, 1 min; disminuyendo 1°C por ciclo y extensión a 72°C grados, 1 min. Este paso fue seguido por 30 ciclos de 96°C, 1 min; 62°C, 1 min y 72°C 1 min; y un ciclo de 72°C, 8 min para extensión final. Por cada set de PCRs se colocó un control positivo (DNA de MAP) y uno negativo (agua destilada estéril). El producto amplificado se sometió a electroforesis en gel de agarosa (2% p/v) y el DNA se visualizó en transiluminador de luz azul, teñido con Syber Safe™. Para las muestras positivas se identificó la presencia de una banda de 217pb.

Para la detección otras micobacterias se amplificó la secuencia *hsp65*, utilizando la misma mezcla de reacción descrita pero reemplazando los *primers* por TB11 (ACCAACGATGGTGTGTCCAT) y TB12 (CTTGTCGAACCGCATACCCT) (Telenti *et al.*, 1993). La amplificación consistió en 45 ciclos de 96°C, 1 minuto; 56°C, 1 minuto y 72°C 1 minuto; y un ciclo de 72°C, 8 minutos para extensión final. Por cada set de PCRs se colocó un control positivo (DNA de micobacterias) y uno negativo (agua destilada estéril). El producto amplificado se sometió a electroforesis en gel y el DNA se visualizó en transiluminador de luz azul, teñido con Syber Safe™. Para las muestras positivas se identificó la presencia de una banda de 440pb. Previamente se probaron distintas temperaturas de *annealing* de *primers* para lograr disminuir el límite de detección para muestras de leche inoculadas.

RESULTADOS

1. DETERMINACIÓN DE PROTOCOLO DE CULTIVO PARA IDENTIFICACIÓN DE MAP

1.1. Leche cruda

Todos los métodos de descontaminación, excepto el método D, aplicados a la leche cruda fueron incapaces de eliminar la flora contaminante presente en las muestras. El método D eliminó toda la contaminación presente en las fases grasa y *pellet*, observándose que la cantidad de colonias aisladas fue mucho mayor en la grasa. Los resultados se muestran en la Tabla 1.

Con respecto al tiempo de aparición y visualización de las primeras colonias pudo determinarse que a los 30 días de sembrados los cultivos solo pueden observarse unas colonias incipientes en los cultivos de los inóculos, siendo entre los 45 y 60 días post cultivo el momento adecuado para la realización de los recuentos de UFC (Tabla 1).

Tabla 1: Resultados de la evaluación de los métodos de descontaminación en leche cruda inoculada con alta concentración de MAP

Método	Contaminación	Tiempo	UFC/mL recuperadas
A	Contaminación	-	-
B	Contaminación excepto en cultivos de grasa	30 días	>100
C	Sin contaminación	45 días	>100 Mayor cantidad en grasa que en <i>pellet</i>
D	Contaminación excepto en cultivos de grasa	30 días	>100
E	Contaminación	-	-
F	Contaminación	-	-
G	Contaminación	-	-

Teniendo en cuenta que cada muestra fue inoculada con una concentración final aproximada de 10^6 UFC /mL de MAP y según los resultados mostrados en la Tabla 1, la descontaminación química (método B, C y D) disminuiría entre 3 y 4 logaritmos (log) la cantidad de MAP viables presentes en la leche cruda.

En las muestras inoculadas con baja concentración de MAP no se observó crecimiento.

1.2. Leche pasteurizada

Dado que en leche cruda fue determinado el método D como más eficaz para la descontaminación, los ensayos en leche pasteurizada se realizaron solo con este método en comparación con el método A o sin descontaminar.

En las muestras de leche pasteurizada solo se observó contaminación en 2/8 muestras sin descontaminar y en 1/8 tratadas por el método D. Sin embargo, no utilizar descontaminación química permitió el aislamiento de una mayor cantidad de UFC/mL de MAP (Tabla 2).

Las muestras tratadas por el método D evidenciaron un retraso de crecimiento de 20 días promedio con respecto a las muestras sin descontaminar.

En las muestras que poseen la concentración más baja de MAP es más factible el recuento ya que las colonias se encuentran más separadas.

Tabla 2: Recuentos de UFC/mL de leche pasteurizada de distintas marcas comerciales (LS y SB) inoculada artificialmente y con diferentes concentraciones de MAP.

Muestra	Método D			Sin descontaminación		
	Rep 1	Rep 2	Promedio	Rep 1	Rep 2	Promedio
10⁶ LS	81	187	134	cont	222	222
10⁴ LS	2	cont	2	382	335	358.5
10⁶ SB	13	46	29.5	111	132	121.5
10⁴ SB	0	0	0	cont	cont	-

Rep: Repetición, cont: contaminación

1.3. Límite de detección

Se calculó el límite de detección para dos metodologías de descontaminación de muestras de leche cruda seleccionados tras la observación y análisis de los resultados anteriores: sin descontaminación y método D. También se calculó para leche pasteurizada UAT sin descontaminar. En la Tabla 3 puede observarse que en muestras de leche cruda descontaminadas con ácido oxálico (5% p/v) el límite de detección es menor al obtenido utilizando HPC (0,75% p/v) durante 5 h. Por otro lado, para leche pasteurizada, sin realizar ningún proceso de descontaminación química se observó un límite de detección igual a 10^3 UFC/mL de leche. Si bien para ácido oxálico y para sin descontaminar el límite fue el mismo, en este último se aislaron mayor cantidad de colonias en los cultivos en los que se produjo crecimiento de MAP.

Tabla 3: Recuentos de UFC/mL de leche cruda y pasteurizada inoculada artificialmente con diferentes concentraciones de MAP.

	Método D Leche cruda	Método B Leche cruda	Sin descontaminación Leche UAT
Sin Inóculo	s/c	s/c	s/c
10^0	s/c	s/c	s/c
10^1	s/c	s/c	s/c
10^2	s/c	s/c	s/c
10^3	2	s/c	25
10^4	2	s/c	289
10^5	108	s/c	Incontables
10^6	Incontables	Incontables	Incontables

s/c: sin crecimiento

2. DETERMINACIÓN DE PROTOCOLO DE PCR PARA IDENTIFICACIÓN DE MAP Y OTRAS MICOBACTERIAS

2.1. Método de extracción de ADN por fenol

2.1.1. Extracción de ADN a partir de cepas

Todas las cepas de MAP utilizadas como inóculo fueron previamente analizadas por IS900PCR resultando positivas en todos los casos.

2.1.2. Extracción de DNA a partir de leche

Se determinó el límite de detección de extracción de ADN con posterior amplificación como se describe en 3.3.1, pudiendo observarse la banda característica de 217pb correspondiente a MAP en las muestras inoculadas con 10^8 , 10^7 , 10^6 y 10^5 UFC/mL de leche, como se muestra en la Figura 1. Además se probaron dos cepas bacterianas distintas a MAP (*E. coli* y *S. aureus*) para comprobar la especificidad de la amplificación.

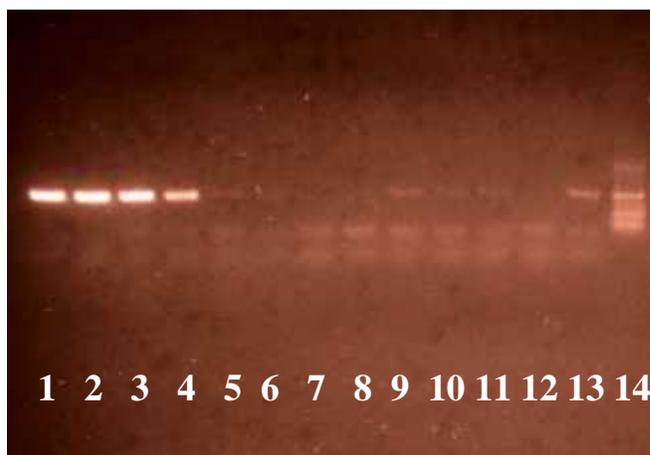


Figura 1: Evaluación del límite de detección de la amplificación de ADN de MAP extraído mediante el método del fenol a partir de muestras de leche inoculadas artificialmente con diferentes concentraciones de MAP. Línea 1-9: 10^8 - 10^0 UFC/mL, línea 10: ADN de *E. coli*, línea 11: ADN de *S. aureus*, línea 12: control negativo, línea 13: control positivo (ADN de MAP) y línea 14: marcador de peso molecular (50 Marker, Promega, USA).

2.2 Método de extracción de ADN utilizando perlas inmunomagnéticas (IMB)

Se determinó el límite de detección de esta técnica de extracción de ADN con posterior amplificación como se describe en 2.4, pudiendo observarse la banda característica de 217pb correspondiente a MAP en las muestras inoculadas con 10^5 y 10^4 UFC/mL de leche, como se muestra en la Figura 2.



Figura 2: Evaluación del límite de detección de la amplificación IS900 de ADN de MAP extraído mediante IMB a partir de muestras de leche inoculadas artificialmente con diferentes concentraciones de MAP. Línea 1: control positivo (ADN de MAP), Línea 2: control negativo, línea 3: ADN de *E. coli*, línea 4-9: 10^0 - 10^5 UFC/mL, línea 10: muestra de leche sin inocular.

2.3 Método de extracción de ADN mediante Kit comercial

Se determinó el límite de detección de esta técnica de extracción de ADN con posterior amplificación como se describe en 3.3.1, pudiendo observarse la banda característica de 217pb correspondiente a MAP en las muestras inoculadas con 10^6 , 10^5 y 10^4 UFC/mL de leche, como se muestra en la Figura 3.

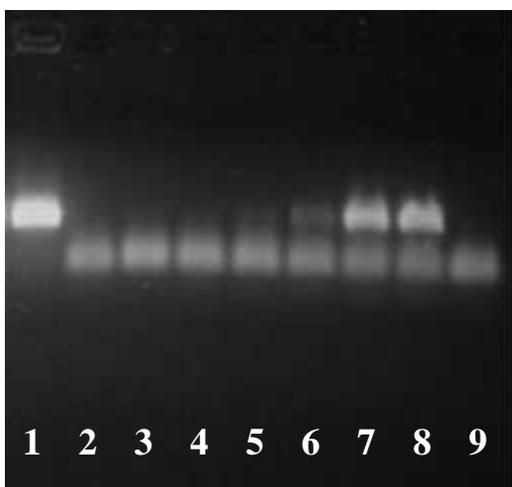


Figura 3: Evaluación del límite de detección de la amplificación IS900 de ADN de MAP extraído mediante kit comercial a partir de muestras de leche inoculadas artificialmente con diferentes concentraciones de MAP. Línea 1: control positivo (ADN de MAP), Línea 2: control negativo, línea 3-8: 10^1 - 10^6 UFC/mL, línea 9: muestra de leche sin inocular

También se evaluó la misma metodología de extracción de ADN pero amplificando el mismo para detección del gen *hsp65*. Se realizaron modificaciones a la técnica descrita por Taylor *et al.* (2001). Se probaron varias temperaturas de *annealing* de *primers* siendo la de 56°C con la que se obtuvo mayor sensibilidad de la técnica. En la Figura 4 se muestra el límite de detección obtenido, igual a 10^5 UFC/mL.



Figura 4: Evaluación del límite de detección de la amplificación hsp65 de ADN de MAP extraído mediante kit comercial a partir de muestras de leche inoculadas artificialmente con diferentes concentraciones de MAP. Línea 1: control positivo (ADN de MAP), Línea 2: control negativo, línea 3-5: 10^6 - 10^4 UFC/mL.

DISCUSIÓN

El método de descontaminación más eficaz fue el método D (ácido oxálico), tanto en muestras de leche cruda como en pasteurizada ya que en ningún caso se detectó contaminación luego del tratamiento, a pesar de que disminuye la carga inicial de bacterias en el orden de 3 log de UFC/mL. La leche cruda proveniente de tanques de enfriado de tambos tiene un nivel más alto de microflora contaminante, por ende, debe aplicarse un método de descontaminación previo al cultivo para evitar habría un crecimiento excesivo de otros microorganismos en los cultivos que podrían limitar el crecimiento de MAP y su identificación (Grant *et al.*, 2002a).

En el caso de las leches pasteurizadas no sería necesario utilizar descontaminación química ya que la flora contaminante es eliminada por el tratamiento térmico y así se logra aislar una mayor cantidad de micobacterias ampliando las posibilidades para su detección. Estos resultados coinciden con lo afirmado por Slana *et al.* (2008) donde también aseguran que el método y la descontaminación para eliminar selectivamente la flora contaminante en leche son factores críticos para asegurar una alta sensibilidad en la detección de MAP.

En otros trabajos realizados para evaluar la metodología de cultivo de leche para detección de MAP utilizando leche inoculada artificialmente, la mayoría de las células de MAP sedimentaron al *pellet* luego de la centrifugación y se hallaron en poca cantidad en la fracción grasa (O'Reilly *et al.*, 2004). En el presente trabajo la mayor cantidad de micobacterias fue detectada en la fase grasa de la leche, es por ello que, luego del centrifugado de las muestras, deberían utilizarse para cultivo tanto la grasa como el *pellet*, priorizando la primera.

Se calculó el límite de detección de cada una de las seleccionadas como más eficaces: Para leche cruda se utilizó el método D y el método B y para leche pasteurizada se utilizó el método A. Tanto para el método D como para el método A, el límite de detección observado fue del orden de 10^3 UFC de MAP/mL de leche cruda o pasteurizada, respectivamente. Por el contrario, para el método B el límite de detección observado fue mayor lo cual evidencia que el ácido oxálico utilizado en la concentración y tiempo indicados, sería menos agresivo contra esta micobacteria que el HPC al 0,75% por 5 h. Dundee *et al.* (2001) calcularon para el método B, un límite de detección igual a 30 UFC/40 mL de leche cruda proveniente de tanques de enfriado el cual fue más eficiente que el observado en el presente trabajo. Dundee *et al.* (2001) también demostraron que una proporción significativa de células de MAP presentes en la leche, no son recuperadas luego de la

descontaminación independientemente del método de descontaminación que se utilice. Como consecuencia del centrifugado inicial, las células de MAP podrían formar agregados que no se disgregarían previo al recuento, desestimando el verdadero número de UFC de MAP presentes en la muestra. Esto fue observado en el presente trabajo, ya que con la utilización del método A el número de MAP presentes inicialmente en la muestra de leche, disminuyó 3 órdenes logarítmicos.

En resumen, el método A para leche pasteurizada y el método D para leche cruda resultaron los más sensibles y fueron coincidentemente las metodologías menos laboriosas y más rápidas de realizar, permitiendo procesar un mayor volumen de muestras en menos tiempo. A pesar de los resultados, si la concentración de MAP en la leche es baja, el uso de estas metodologías sería una limitante para su detección, debiendo poner énfasis en la modificación de las mismas para mejorar el límite de detección de MAP.

La serología y el cultivo de materia fecal son las metodologías más comúnmente usadas para el diagnóstico de PTBC en los programas de control de la enfermedad, estando más restringido el uso de la PCR que aún no es implementada en los programas de control por su relativa baja sensibilidad (Gao *et al.*, 2009). Muchos trabajos de investigación se han realizado con el objetivo de mejorar la sensibilidad de la PCR para detección de MAP en muestras de leche (Sweeney *et al.*, 1992; Khare *et al.*, 2004; O'Mahony y Hill, 2004; Gao *et al.*, 2007; Pinedo *et al.*, 2008; Gilardoni, 2012).

En el presente trabajo se probaron diferentes metodologías de extracción de ADN de MAP a partir de leche y resultaron positivas las muestras inoculadas con 10^8 , 10^7 , 10^6 y 10^5 UFC/mL de leche utilizando la metodología de extracción con fenol cloroformo descripta. Sin embargo, utilizando las metodologías de extracción de IMB y kit comercial se detectaron las bandas específicas en las muestras inoculadas con 10^4 UFC/mL o más, por lo cual este sería el límite de detección de ambas metodologías. Estas mostraron mayor sensibilidad que la técnica del fenol cloroformo y además son menos laboriosas, más rápidas y no es necesaria la manipulación de sustancias tóxicas, siendo las elegidas en el resto de los ensayos del presente trabajo.

El uso de IMB y kit comercial fue probado por otros investigadores, obteniendo diferentes resultados. Con respecto a la técnica de IMB, Grant *et al.* (1998) observaron un límite de detección de 10^4 a 10^5 UFC/mL utilizando Ac policlonales en leche contaminada experimentalmente con MAP, siendo estos valores similares a los observados al presente trabajo. Gilardoni (2012),

utilizando un Ac policlonal detectó 10^3 UFC/mL. Con respecto al kit comercial, Odumeru *et al.* (2001) observaron un límite de detección de 10^5 UFC/mL, el cual es mayor al observado en el presente trabajo.

Tanto la metodología de IMB como la del kit comercial utilizadas permiten extraer el ADN total presente en las muestras de leche, tanto de bacterias viables o no viables. Por tal motivo, un resultado positivo a IMB-PCR no indica obligatoriamente la presencia de MAP viable. En el presente trabajo la sensibilidad de la técnica de cultivo fue mayor que la de la técnica de PCR, estos resultados coinciden con lo publicado por Shankar *et al.* (2010) quienes cultivaron y realizaron PCR a partir de muestras de leche cruda y pasteurizada encontrando un 44% de muestras de leche cruda positivas a cultivo y un 6% positivas a PCR, y en cuanto a las muestras pasteurizadas, un 67% resultaron positivas a cultivo y un 33% positivas a PCR. Sin embargo difieren con la mayoría de otras publicaciones que sostienen la mayor sensibilidad de la PCR con respecto al cultivo a partir de leche cruda y pasteurizada (Stabel *et al.*, 2002; Grant *et al.*, 2003; Reddacliff *et al.*, 2003; Gao *et al.*, 2005; Jayarao *et al.*, 2004; Ayele *et al.*, 2005; Ellingson *et al.*; 2005a y Gilardoni, 2012). A diferencia del presente trabajo en donde se utilizó un solo set de *primers*, otros trabajos utilizan PCR anidada o dos pares de *primers*, lo cual aumenta la sensibilidad de la técnica obteniendo mejores resultados. Teniendo en cuenta de que el MAP puede estar presente en muy poca cantidad en las muestras de leche y el ADN extraído puede no llegar a la concentración suficiente como para ser detectado por PCR, debería enfatizarse el aumento de la sensibilidad de ésta técnica ya que ofrece como principal ventaja sobre el cultivo, la rapidez en la obtención de los resultados además de la sencillez metodológica, entre otras.

CAPÍTULO II

Procesamiento de productos lácteos

INTRODUCCIÓN

Muchos trabajos de investigación han demostrado que MAP es capaz de sobrevivir a la pasteurización cuando está presente en la leche cruda (Grant *et al.*, 1996; Hammer *et al.*, 2002), pero relativamente pocos trabajos han sido publicados sobre la supervivencia de MAP en otros productos lácteos.

En general, los productos lácteos fermentados proveen barreras significativas contra el crecimiento de microorganismos patógenos mediante el tratamiento térmico, seguido del agregado de cultivos *starter*, la acidez producida durante la fermentación y el almacenamiento refrigerado. Se desconoce si las etapas antes mencionadas que se llevan a cabo durante el proceso de elaboración de yogur, son suficientes para eliminar células de MAP viables. van Brandt *et al.* (2011a) elaboraron yogur inoculando leche UAT con MAP y observaron que los recuentos iniciales de MAP, durante la fermentación seguida del almacenamiento a 6° C, no se modificaron luego de 6 semanas, independientemente del cultivo *starter* que fuera utilizado o del contenido de grasa de la leche utilizada para la elaboración.

El comportamiento de otras bacterias como *E. coli* o *Listeria monocytogenes* en este producto ha sido investigado. *E. coli* es un importante patógeno alimentario causante de Enfermedades Transmitidas por Alimentos (ETAs) y los productos lácteos pueden contener esta bacteria, probablemente debido a una contaminación post pasteurización. *E. coli* O157:H7 es la bacteria más estudiada de la Flia. Enterobacteriaceae y se ha demostrado que es capaz de sobrevivir las condiciones ácidas generadas durante la preparación de yogur. Massa *et al.* (1997) encontraron que *E. coli* O157:H7 sobrevive las condiciones de fermentación con pH menores a 4.5 y temperaturas por encima de 42°C. Bachouri *et al.* (2006) encontraron que *E. coli* O157:H7 crece durante la preparación de yogur y sobrevive durante 10-21 días a diferentes temperaturas de refrigeración. Otros estudios han demostrado que el agregado de cultivos probióticos al yogur disminuye la viabilidad de *L. monocytogenes* y *E. coli* O157:H7 durante el período de almacenamiento (Barrantes *et al.*, 2004; Nettles y Barefoot, 1993). Sin embargo, no existen estudios similares realizados para evaluar el comportamiento de *Salmonella* Enteritidis (*S. Enteritidis*).

MAP, además, podría estar presente en quesos, especialmente aquellos que se elaboran con leche sin pasteurizar. En este tipo de productos lácteos, el bajo pH y la concentración de sal son los dos factores más importantes que contribuyen a la inactivación de patógenos durante el proceso de maduración. Collins y Sung. (2000) estudiaron el efecto de tres factores sobre la viabilidad de MAP

en quesos (pH, concentración de sal y tratamiento térmico), determinando que el calentamiento y el bajo pH afectaron la viabilidad de este patógeno, pero no la concentración de sal. Otras investigaciones realizadas en quesos duros y semiduros elaborados con leche cruda artificialmente contaminada con MAP demostraron que los recuentos decrecieron lentamente durante la maduración y relacionaron la muerte del bacilo con la temperatura aplicada durante la elaboración y el descenso del pH durante la maduración de los quesos (Spahr y Schafroth, 2001). Otros estudios demostraron que la población de micobacterias puede concentrarse durante la producción de quesos y que MAP puede sobrevivir al proceso de maduración de este producto por más de 27 semanas (Donaghy *et al.*, 2004). Un estudio realizado por nuestro grupo de investigación demostró que MAP puede sobrevivir en quesos elaborados con leche bovina hasta los 45 días de maduración y en los quesos elaborados con leche de origen caprino por más de 60 días (Cirone *et al.*, 2006). Igualmente, fueron estudiados los efectos del pH durante la maduración de estos quesos hallando una correlación positiva entre este factor y la viabilidad de la micobacteria en casos de quesos elaborados con leche caprina. Ikonopoulou *et al.* (2005) investigaron la presencia de MAP en distintos tipos de quesos comercializados en Grecia y República Checa y encontraron que un 31.7% y un 3.6% de las muestras testeadas fueron positivas por PCR y cultivo, respectivamente. Además, pudieron correlacionar el mayor porcentaje de positividad con los quesos que tenían menor concentración de NaCl (<2%). El aislamiento de MAP a partir de quesos comerciales, si bien se dio en baja frecuencia, indica que estos productos podrían ser otra fuente de exposición del humano a esta micobacteria. En otro estudio realizado en Suiza fueron tomadas muestras de distintos tipos de quesos comerciales y en los cultivos correspondientes no se observaron colonias de MAP viables. Sin embargo, de un total de 143 muestras de estos quesos solo 6 (4,2%) resultaron positivas a PCR en Tiempo Real, confirmando la presencia de MAP (Stephan *et al.*, 2007).

Los objetivos del presente capítulo fueron: a) evaluar la supervivencia de MAP, durante la elaboración y almacenamiento tradicional de yogur y de quesos blandos elaborados con leche bovina y b) evaluar el comportamiento y viabilidad de MAP en yogur frente a la presencia de otras bacterias como *E. coli*, and *S. Enteritidis*.

DISEÑO EXPERIMENTAL: MATERIALES Y MÉTODOS

1. EVALUACIÓN EN YOGUR

1.1. Cultivos de bacterias e inóculos

Se prepararon tres diferentes inóculos: cada uno consistió una suspensión de MAP, *E. coli*, o *S. Enteritidis* en 15 mL de PBS, pH=7,2, a una concentración aproximada de 0.5 en la escala de McFarland (Cruickshank *et al.*, 1975) 1.5×10^8 (UFC/mL).

Se utilizaron las siguientes cepas bacterianas:

-MAP (Cepa INTA SB)

-*E. coli* (Cepa INTA 116/C3)

-*S. Enteritidis* (Cepa INTA 86/360)

Para la preparación de los inóculos, las cepas mencionadas anteriormente se cultivaron sobre medios de cultivo sólidos. MAP se cultivó en medio HEYM con el agregado de micobactina J al 0.0002% (peso/vol) (Allied Monitor Inc., Fayette, Mo, USA.) y piruvato de sodio (Sigma Chemical Co., St. Louis, Mo, USA.) por 8 semanas a 37°C. Por otro lado, *E. coli* y *S. Enteritidis* fueron cultivadas en agar Mc Conkey (Oxoid, England) y agar XLDT4 (Oxoid, England), respectivamente, e incubadas a 37°C durante 24 h. Posteriormente, una colonia se suspendió en PBS pH 7.2, y se sembró en un caldo de cerebro-corazón (Oxoid, England), que se incubó durante la noche a 37°C.

1.2. Preparación del yogur

Tres yogures tradicionales se prepararon utilizando 360 mL de leche UAT, 125 g de yogur comercial y 5 mL de la suspensión bacteriana correspondiente (McFarland 0.5), a saber:

Yogurt 1 (Y1): MAP,

Yogurt 2 (Y2): *E. coli* -*S. Enteritidis*,

Yogurt 3 (Y3): MAP- *E. coli* -*S. Enteritidis*.

La fermentación se llevó a cabo en un agitador orbital termostático (Modelo E24, New Brunswick Scientific) a 43°C por 3 h. Posteriormente, los yogures fueron almacenados a 4°C por 20 días.

1.3. Muestras

Se tomaron muestras de 50 mL antes y durante todo el tiempo de preparación en: 20 min, 45 min, 65 min, 90 min, 115 min, 135 min, 155 min, 180 min, and 270 min, y durante el almacenamiento: 4.5 h, 24 h, 48 h, 4 días, 10 días, 15 días, and 20 días. A cada muestra se le realizaron los recuentos de MAP, *E. coli* y *S. Enteritidis*, y se midió el pH.

1.4. Recuento de bacterias

MAP: 35 mL de cada yogur fueron centrifugados a 6000 rpm durante 20 min en una centrífuga refrigerada (Sigma 16-K, Alemania), se descartó el sobrenadante y el sedimento se resuspendió en 15 mL de ácido oxálico en 5% (peso/vol) (Taquet *et al.*, 1967). Las muestras se mantuvieron a 37° C durante 10 min y luego se centrifugaron una vez más. Luego, el sedimento se resuspendió en 2 mL de PBS y cuatro gotas se cultivaron en HEYM más antibióticos. Los medios fueron incubados a 37°C por 16 semanas. Se examinaron semanalmente para detectar la presencia de colonias MAP. Las colonias fueron analizadas microscópicamente mediante la coloración de ZN (OIE, 2011). Los recuentos se expresaron en UFC/mL de yogur.

***E. coli* y *S. Enteritidis*:** se tomaron 5 mL de la muestra original y se realizaron diluciones seriadas al décimo en PBS (pH 7.2). Una alícuota de 0.02 mL de cada dilución fue sembrada por triplicado en placas de agar Mc Conkey y agar XLDT4 para los recuentos de *E. coli* y *S. Enteritidis*, respectivamente. Las placas se incubaron durante la noche a 37°C y los resultados se expresaron como UFC/mL de yogur.

1.5. Determinación de pH

El pH de cada muestra fue medido utilizando peachímetro digital (Schott Gerate, CG 820, USA).

1.6. Análisis estadístico

Se realizaron curvas de regresión lineal de los recuentos con respecto al tiempo de preparación y el almacenamiento. El análisis se realizó sólo para *E. coli* y *S. Enteritidis* comparando el comportamiento de ambas bacterias en el mismo yogur y en los distintos yogures, con o sin presencia de MAP. Se utilizó el programa software de análisis estadístico Statistical Analysis Software (SAS, 1998).

2. EVALUACIÓN EN QUESOS

2.1. Cultivos de bacterias e inóculos

Para la preparación de los inóculos, fue utilizada una cepa de MAP perteneciente a la colección del laboratorio de Bacteriología de la Unidad Integrada Balcarce, aislada a partir de materia fecal de bovinos, denominada Santo Domingo 381 y se cultivó sobre medios de cultivo sólidos: MAP se cultivó en medio HEYM con el agregado de micobactina J al 0.0002% (peso/vol) (Allied Monitor Inc., Fayette, Mo, USA.) y piruvato de sodio (Sigma Chemical Co., St. Louis, Mo, USA.) por 8 semanas a 37°C. Se preparó un inóculo que consistió en una suspensión de MAP en 10 mL de PBS, pH=7,2, a una concentración aproximada de 0.5 en la escala de Mc Farland 1.5×10^8 UFC/mL. Se realizaron diluciones seriadas al décimo para obtener las diluciones correspondientes para inocular la leche, previo a la elaboración de los quesos.

2.2. Elaboración

Se elaboraron en total 6 quesos:

- a. 2 quesos sin inóculo de MAP (Control)
- b. 2 quesos inoculados con MAP en baja concentración: 10^2 UFC/mL (QB)
- c. 2 quesos inoculados con MAP en alta concentración: 10^5 UFC/mL (QA)

Para ello se filtraron 9 litros de leche cruda obtenida del ordeño matutino del tambo de la EEA INTA Balcarce, utilizando gasa esterilizada. La leche se dividió en 6 partes de 1,5 litros. Se inocularon dos partes de leche con las suspensiones de MAP correspondientes para lograr una concentración final de 10^2 UFC/mL (QB) y otras dos partes a una concentración final de 10^5 UFC/mL (QA). Las dos partes restantes se mantuvieron sin inocular (Control). Cada parte se calentó a 68°C durante 15 minutos en un Erlenmeyer sumergido en baño termostatzado. Luego se dejó enfriar a 36°C y se lo mantuvo a esta temperatura para continuar con la preparación. Se agregaron 2 cucharadas de yogur natural sin saborizantes y se mezcló hasta obtener una mezcla homogénea. Se agregaron 3 g de cloruro de calcio y se mezcló suavemente hasta que la formación de un coágulo o gel. Se lo dejó reposar 15 minutos a 36°C y luego se agregaron 900 µL del coagulante comercial (según indicaciones del fabricante). Se mezcló suavemente con agitador durante 1 o 2 minutos y luego se dejó en reposo para asegurar una buena coagulación. Luego de 30 minutos se cortó la cuajada utilizando cuchillo de hoja larga haciendo un corte vertical cada 2 cm y otro perpendicular al anterior cada 2 cm. Se mezcló suavemente mientras se elevó la temperatura a 39-40°C, durante 15

minutos. Con ayuda de un colador, se separó el suero. La cuajada se trasvasó a los moldes perforados para ser prensada durante 30 minutos y luego se voltearon para prensar durante otros 30 minutos. Se sacó el queso del molde y se lo colocó en una bandeja con salmuera a 8°C durante 1 hora. Por último se retiró de la salmuera y se conservó a temperatura de refrigeración hasta el final del ensayo.

2.3. Muestras

Se tomó una muestra de la leche sin inocular para corroborar la ausencia de MAP viables en leche cruda. Luego, se tomaron 5 muestras durante el proceso de elaboración y a los 1, 7, 14, 21 y 28 días durante el almacenamiento refrigerado.

2.4. Recuento de MAP

Se tomaron 5 g de muestra del centro de cada queso. Las mismas fueron colocadas en bolsas de polietileno, junto al agregado de 60 mL de ácido oxálico (5%p/v) (Oxoid, England) y maceradas en homogeneizador durante 2 minutos. Se trasvasó el homogenato a tubos de centrifuga estériles y se mantuvo a 37°C durante 10 minutos. Luego cada muestra fue centrifugada a 9000 rpm durante 15 minutos en una centrífuga (Sorvall RC5CE, Newtown, USA), resuspendiendo el *pellet* con 3 mL de PBS. Cuatro gotas se cultivaron en HEYM más antibióticos. Los medios fueron incubados a 37°C por 16 semanas. Se examinaron semanalmente para detectar la presencia de colonias MAP. Las colonias fueron analizadas microscópicamente mediante la coloración de ZN (OIE, 2011). Los recuentos se expresaron en UFC/g de queso.

2.5. Determinación de pH

El pH de cada muestra fue medido utilizando peachímetro digital (Schott Gerate, CG 820, USA).

RESULTADOS

1. EVALUACIÓN EN YOGUR

1.1. Recuento de bacterias

1.1.1. MAP

Al comienzo del proceso de elaboración del yogur, los recuentos de MAP en Y1 e Y3 fueron 46 y 127 UFC/mL respectivamente. Durante el proceso de elaboración y hasta los 135 minutos, MAP no fue detectado en ninguno de los dos yogures. Luego, a los 180 minutos, los recuentos de MAP en Y1 se elevaron a 5.6 UFC/mL, sin embargo en Y3 no fue aislado. Luego de las 4.5 horas y durante el almacenamiento a 4°C las UFC/mL se incrementaron llegando a un máximo de 56,5 y 62,7 UFC/mL en el día 4 de almacenamiento en ambos yogures. Luego, la viabilidad comenzó a descender nuevamente hasta el final del procesamiento (Figura 5 y 6).

Figura 5: UFC/mL de MAP durante la preparación y almacenamiento refrigerado de Y1 e Y3.

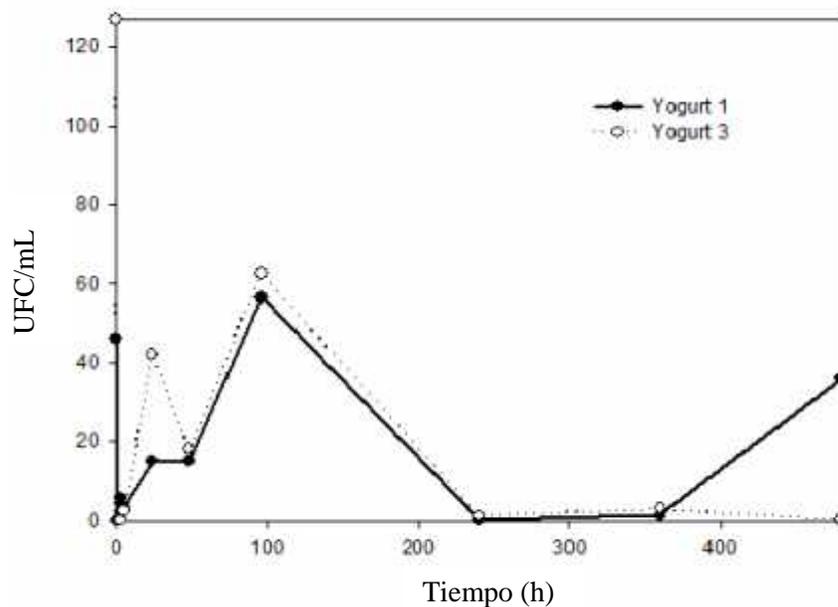
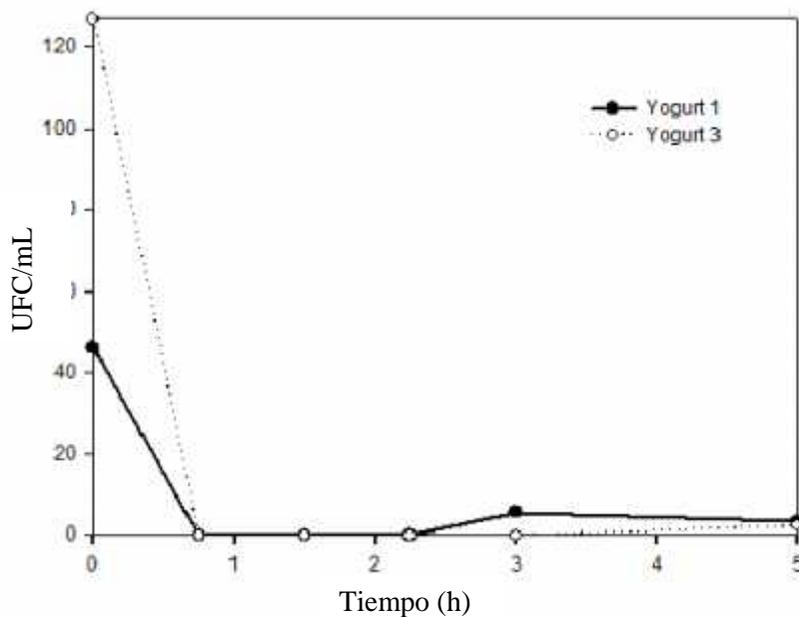


Figura 6: UFC/mL de MAP durante la preparación de Y1 e Y3

1.1.2. *E. coli* y *S. Enteritidis*

Los recuentos iniciales para *E. coli* and *S. Enteritidis* fueron 5.3 y 5.5 log de UFC/mL disminuyeron durante la primera hora durante la elaboración. Ambas bacterias alcanzaron los máximos recuentos a las 24 horas (6.4 log de UFC/mL para *E. coli* y 5.3 log de UFC/mL para *S. Enteritidis*). La viabilidad de ambas bacterias continuó cayendo hasta el final del ensayo (5 log para *E. coli* y 4.6 log para *S. Enteritidis*) (Figura 7, 8, 9 y 10).

Figura 7: Log de UFC/mL de *E. coli* y *S. Enteritidis* durante la preparación y almacenamiento refrigerado de Y3

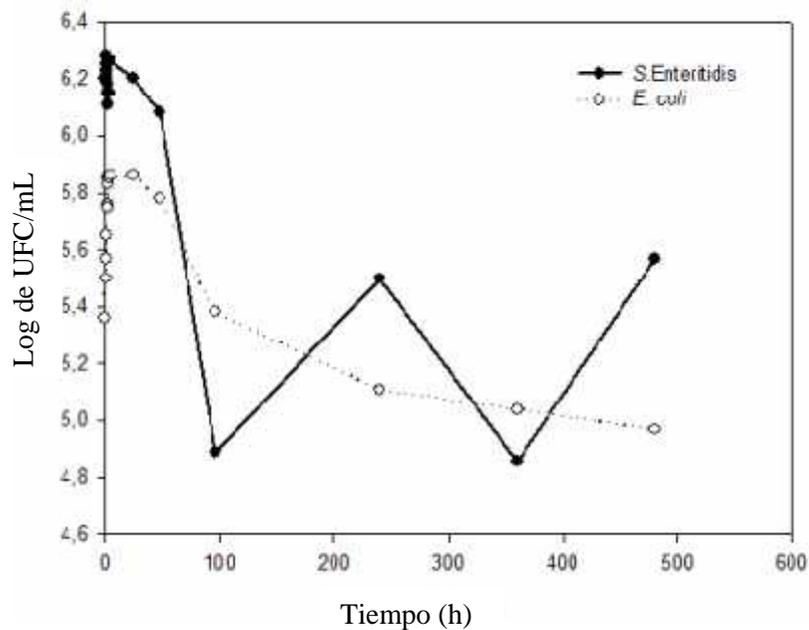


Figura 8: Log de UFC/mL de *E. coli* y *S. Enteritidis* durante la preparación de Y3

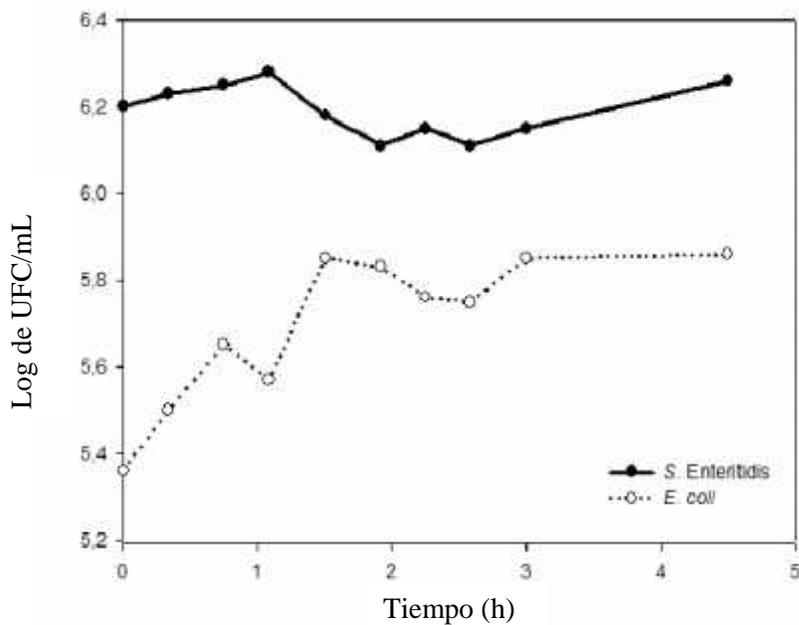


Figura 9: Log de UFC/mL de *E. coli* y *S. Enteritidis* durante la preparación y almacenamiento refrigerado de Y2

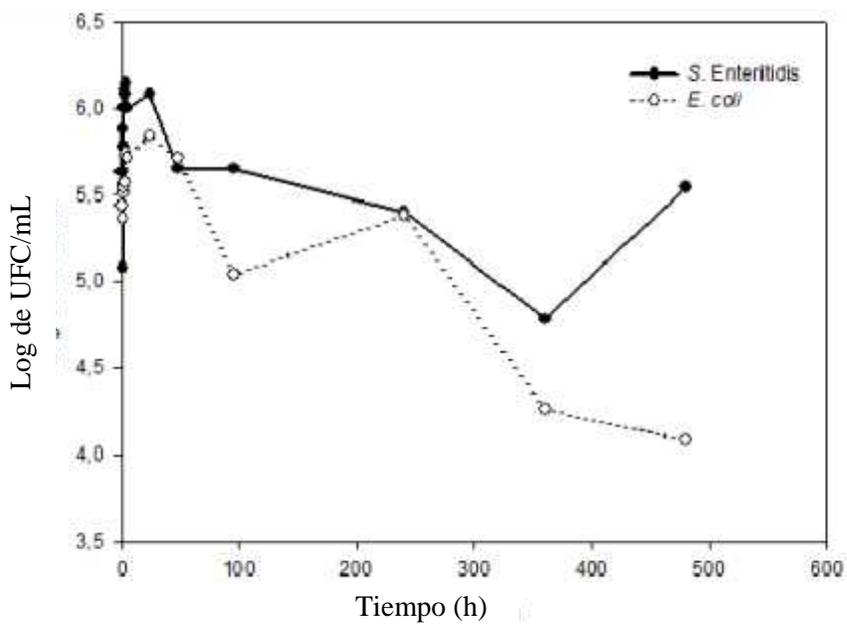
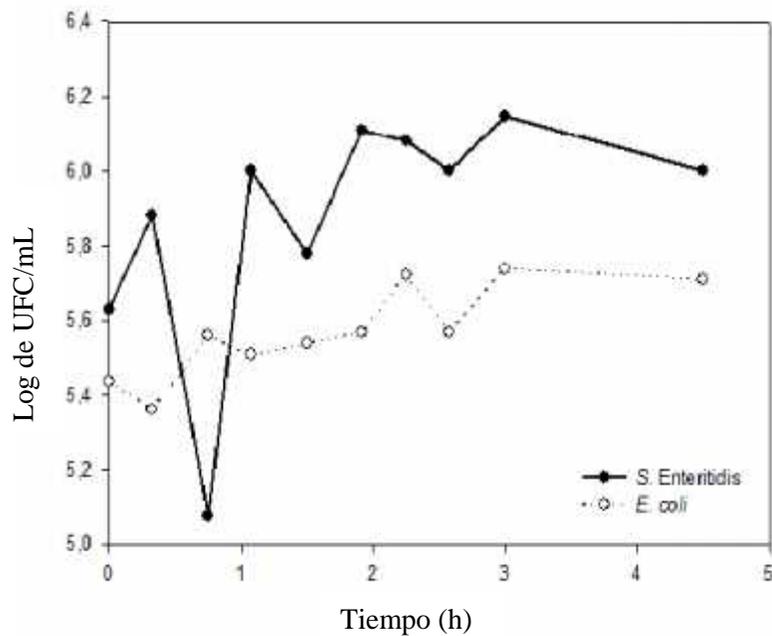


Figura 10: Log de UFC/mL de *E. coli* y *S. Enteritidis* durante la preparación de Y2



1.2. Determinación de pH

El pH inicial fue 6.1 para los tres yogures. Durante el proceso de fermentación el pH disminuyó gradualmente hasta 4.5. Desde los 180 minutos los valores se mantuvieron estables y hasta el final del ensayo (Figura 11 y 12).

Figura 11: Evolución del pH durante la preparación y almacenamiento refrigerado de Y1, Y2 e Y3

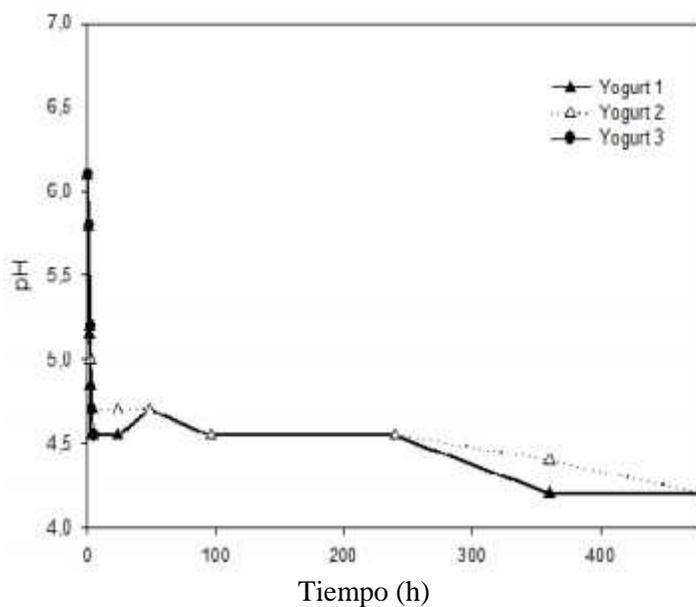
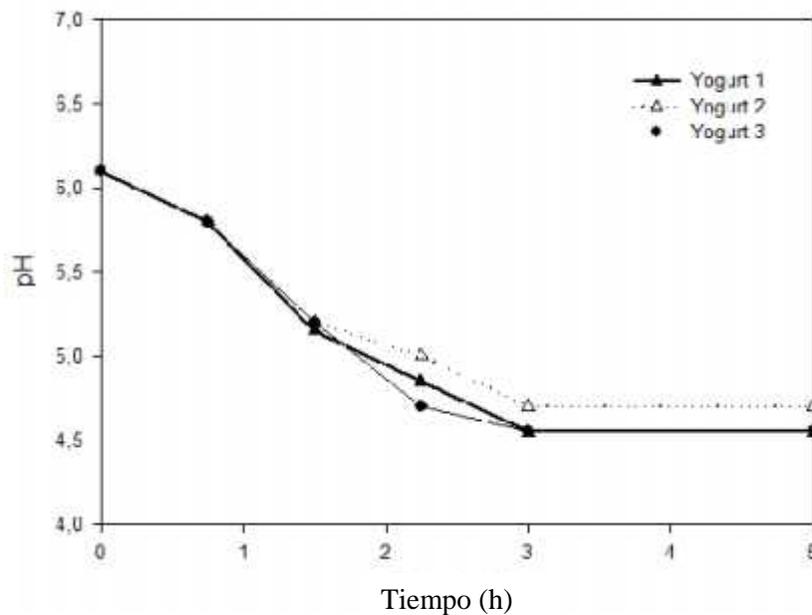


Figura 12: Evolución del pH durante la preparación de Y1, Y2 e Y3

1.3. Análisis estadístico

El análisis de regresión de los log de los recuentos de *E. coli* y *S. Enteritidis* versus el tiempo de elaboración y almacenamiento en Y3 arrojó un R^2 de 0.94, lo cual muestra que la variación en el tiempo causa el 94.25% de la variación en los recuentos de ambas bacterias. Al comparar el comportamiento de ambas bacterias fueron observadas diferencias estadísticas ($p=0.018$). En Y2, el R^2 fue 0.58 indicando que la variación en el tiempo de elaboración y almacenamiento explica el 58.27% de la variación en los recuentos de ambas bacterias. En este caso los comportamientos de ambas bacterias no mostraron diferencias significativas ($p=0.301$). Por otro lado, el análisis del comportamiento de *E. coli* en Y3 y Y2 no mostró diferencias significativas ($p=0.301$). Sin embargo, *S. Enteritidis* mostró un comportamiento diferente en ambos yogures ($p=0.032$).

2. EVALUACIÓN EN QUESOS

2.1. Recuento de MAP

2.1.1. Quesos sin inóculo de MAP (Control)

No se observó crecimiento de MAP en ninguna de las dos repeticiones de los quesos no inoculados.

2.1.2. Quesos inoculados con MAP en baja concentración (QB)

La concentración final de MAP en la leche inoculada fue de 10^2 UFC/mL. Como puede observarse en la Tabla 4 en la repetición 1, ninguna de las muestras tomadas durante la elaboración se observó crecimiento de MAP en los medios inoculados. Sólo fue recuperada a partir de las muestras de suero separado durante el proceso de coagulación. Sin embargo, en la repetición 2, MAP fue aislado durante el proceso de elaboración y en el suero.

En ambas repeticiones la mayor cantidad de MAP se concentró en el suero, que es separado y descartado durante la elaboración, recuperándose igual cantidad de UFC/g que la inoculada a la leche previa a la elaboración. Por otro lado, en una de las repeticiones MAP fue recuperado del producto final en la muestra tomada el día 2 de almacenamiento refrigerado, disminuyendo la viabilidad 1 log aproximadamente. Luego de ese período, no se observaron células de MAP viables.

Tabla 4: pH y UFC/g de MAP de muestras tomadas durante la elaboración y almacenamiento refrigerado de las dos repeticiones de QB

Tiempo	Muestra	pH Rep 1 y 2	UFC/g Rep 1	UFC/g Rep 2
Elaboración				
0	Leche +inóculo MAP	6.7	-	-
1	Agregado de Calcio	5.5	-	-
2	Coagulado	5.5	-	-
3	Cuajada	6	-	23
4	Suero	5.5	1 x 10 ²	1 x 10 ²
Almacenamiento refrigerado				
5	2 días	6	-	3
6	7 días	6	-	-
7	14 días	6	-	-
8	21 días	6	-	-
9	28 días	6	-	-

Rep: Repetición

2.1.3. Quesos inoculados con MAP en alta concentración (QA)

La concentración final de MAP en la leche inoculada fue de 10⁵ UFC/mL. Como puede observarse en la Tabla 5 en ninguna de las muestras tomadas durante las primeras etapas de la elaboración se observó crecimiento de MAP en los medios inoculados. Pero si fue recuperada a partir de las muestras tomadas en las últimas etapas de este proceso y hasta los 14 días de almacenamiento refrigerado del producto elaborado.

En ambas repeticiones la mayor cantidad de MAP fue recuperada a partir de las muestras tomadas durante la coagulación. Luego, la viabilidad de esta micobacteria disminuyó 1 log aproximadamente y se mantuvo estable hasta los 14 días de almacenamiento refrigerado. En este caso, la cantidad de UFC/mL de MAP inoculadas en el T0 disminuyó 4 log aproximadamente hasta los 14 días de almacenamiento, luego de ese período, no se observaron células de MAP viables.

Tabla 5: pH y UFC/g de MAP de muestras tomadas durante la elaboración y almacenamiento refrigerado de las dos repeticiones de QA

Tiempo	Muestra	pH Rep 1 y 2	UFC/g Rep 1	UFC/g Rep 2
Elaboración				
0	Leche +inóculo MAP	6.7	-	-
1	Agregado de Calcio	5.5	-	-
2	Coagulado	5.5	105	228
3	Cuajada	6	18	20
4	Suero	5.5	20	20
Almacenamiento refrigerado				
5	2 días	6	13	20
6	7 días	6	5	20
7	14 días	6	10	8
8	21 días	6	-	-
9	28 días	6	-	-

Rep: Repetición

2.2. Determinación de pH

En la totalidad de los quesos elaborados el pH mostró un comportamiento similar durante la elaboración y almacenamiento del producto (Tabla 4 y 5): descendió 1 unidad aproximadamente durante las primeras etapas de elaboración, para luego estabilizarse en pH 6 durante el transcurso del almacenamiento refrigerado.

DISCUSIÓN

La leche es un medio rico en nutrientes que favorece el crecimiento de microorganismos, es por ello que la leche cruda puede ser una fuente importante de bacterias patógenas para el humano (Freitas *et al.*, 2009).

Para la producción comercial de yogur y otros productos lácteos fermentados, la leche usualmente es pasteurizada previamente. Sin bien este proceso elimina la mayoría de los microorganismos presentes, se ha demostrado que células de MAP podrían conservar su viabilidad durante este proceso y llegar a los consumidores a través de distintos productos lácteos. Es por ello que es de interés conocer el comportamiento de MAP durante la elaboración y almacenamiento de productos de naturaleza ácida (pH 4-4.5) como el yogur ya que estas condiciones contribuyen generalmente a la inactivación de bacterias patógenas (van Brandt *et al.*, 2011a).

En el presente estudio MAP fue aislado durante el proceso de elaboración del yogur hasta los 20 días de almacenamiento refrigerado, lo cual demuestra la capacidad de esta bacteria de resistir las condiciones ácidas generadas durante la preparación de este producto y las bajas temperaturas de almacenamiento. En todas las muestras los recuentos de MAP fueron bajos debido a la agresividad del método de descontaminación utilizado. Estos resultados coinciden con los publicados por van Brandt *et al.* (2011a), quienes encontraron que los recuentos iniciales de MAP no variaron durante 6 semanas de almacenamiento refrigerado, pero no evaluaron el comportamiento de esta micobacteria durante la preparación del yogur. Sung y Collins (2003) encontraron que MAP, en condiciones de pH bajos generadas *in vitro* expresa dos proteínas específicas relacionadas a la tolerancia ácida. Sin embargo, no pudieron predecir el comportamiento de MAP en alimentos donde existen otros factores que pueden afectar la viabilidad.

En el presente trabajo, MAP no fue aislado durante la preparación del yogur, lo cual sugiere que la caída de pH que se produce en este proceso, podría dañar la micobacteria y evitar su desarrollo en medios de cultivo artificiales. No obstante, MAP fue recuperado a las 4.5 h luego de la inoculación, lo cual podría deberse a que las bacterias se encuentren dañadas o injuriadas a causa del procesamiento y luego atraviesen un período de adaptación.

En cuanto a *S. Enteritidis*, no existen en la bibliografía estudios sobre su supervivencia durante la preparación y almacenamiento de yogur. Sin embargo, muchos trabajos de investigación se han centrado en el estudio de *E. coli*, especialmente el serotipo patógeno O157:H7, el cual es causante del síndrome urémico hemolítico en humanos. Bachouri *et al.* (2006) observó que los

recuentos de *E. coli* O157:H7 se incrementan durante la fermentación, mientras que Dineen *et al.* (1998) encontró que esta bacteria no fue recuperada durante la fermentación del yogur. En el presente estudio se utilizaron altos niveles de inoculación tanto de *S. Enteritidis* como de *E. coli* con el objetivo de asegurar la recuperación de ambas bacterias en los medios de cultivo correspondientes y poder observar la pérdida de viabilidad durante la preparación y almacenamiento del yogur. Los recuentos de *E. coli* decrecieron lentamente durante la preparación, mientras que los de *S. Enteritidis* se mantuvieron estables. Estos resultados, diferentes a los obtenidos por otros investigadores, podrían ser explicados por las diferentes condiciones de fermentación: alta temperatura (46-47°C), mayor período de tiempo (24h) y pH final más ácido (4.1). De forma similar, Soudah *et al.* (1996) observaron que *E. coli* O157:H7 no sobrevivió a la fermentación de yogur que contenía *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* y *Streptococcus thermophilus* a 47°C. Sin embargo, otros investigadores encontraron que *E. coli* O157:H7 sobrevivió a la fermentación del yogur a 42°C (Massa *et al.*, 1997; Govaris *et al.*, 2002). Esto podría deberse a que la exposición de *E. coli* a ambientes ácidos por cortos periodos de tiempo incrementan su tolerancia ácida, aumentando su supervivencia (Tosun y Aktug Gonul, 2005). Estos resultados coinciden con la presente investigación donde, a pesar de observarse un ligero descenso de su viabilidad, *E. coli* fue recuperado durante el proceso de fermentación a 43°C y con un pH final igual a 4.7. Estos resultados sugieren que las condiciones de fermentación son factores importantes que pueden afectar la supervivencia de *E. coli* en el proceso de elaboración del yogur.

Varios estudios han investigado también la viabilidad de *E. coli* durante el proceso de almacenamiento de yogur artificialmente inoculado con esta bacteria. Bachouri *et al.* (2005) observaron que la viabilidad de *E. coli* fue disminuyendo hasta el día 7 de almacenamiento, momento a partir del cual ya no fue recuperada. Govaris *et al.* (2002) no detectaron *E. coli* viables entre los 5 a 8 días de almacenamiento a 4°C y entre los 4 a 6 días, a 12°C. Sin embargo, en el presente trabajo, tanto *E. coli* como *S. Enteritidis* fueron aisladas hasta el día 20 durante el almacenamiento refrigerado, lo cual indicaría que esta bacteria posee cierta capacidad para tolerar las condiciones ácidas generadas en este tipo de productos lácteos cuanto esté presente en la leche cruda.

Observando el comportamiento de las tres bacterias utilizadas en este trabajo pudo determinarse que en Y3 la supervivencia de *S. Enteritidis* fue menor comparada con Y2. Otros estudios deberían ser realizados para estudiar los mecanismos de inhibición competitiva de estos

patógenos *in vitro* así como también su resistencia a diferentes temperaturas y pH para mejorar las condiciones de procesamiento de estos productos lácteos y asegurar su eliminación.

Otras investigaciones han sido realizadas en quesos con el objetivo de determinar la resistencia de MAP durante su elaboración. Collins y Sung (2000) estudió el efecto del pH, concentración de sal y tratamiento térmico en la preparación de quesos, observando la viabilidad de MAP y encontró que el calentamiento de la leche cruda para la elaboración de quesos que se maduraron por 60 días, inactivó aproximadamente 10^3 UFC/mL de MAP. Además, comprobó que la concentración de sal tiene poco efecto deletéreo sobre la viabilidad de este patógeno, sin embargo, el bajo pH fue correlacionado positivamente con la muerte de MAP. Spahr y Schafroth (2001) inocularon artificialmente leche cruda con 10^4 UFC/mL de MAP y elaboraron quesos duros y semiduros, observando que en ambos, los recuentos de esta micobacteria decrecieron durante la maduración. Estos autores concluyeron que la temperatura aplicada durante la elaboración y el descenso del pH durante la maduración fueron los factores más importantes para la muerte de MAP. Otro estudio reveló que MAP puede sobrevivir al proceso de maduración de este producto por más de 27 semanas (Donaghy *et al.*, 2004). Debido a esto, el tiempo de maduración habitualmente utilizado en la industria láctea no sería suficiente para eliminar las células de MAP viables presentes en el producto. Otro hallazgo de importancia se efectuó en Grecia y República Checa donde se estudió la presencia de MAP en distintos tipos de quesos comerciales, hallando un 31,7% y un 3,6% de las muestras positivas por PCR y cultivo respectivamente (Ikonomopoulos *et al.*, 2005). El aislamiento de esta micobacteria a partir de quesos comerciales, si bien se dio en baja frecuencia, indica que estos productos podrían ser otra fuente de exposición del humano a MAP.

En un trabajo previo realizado por nuestro grupo de investigación, no se logró aislar micobacterias a partir de los quesos elaborados con leche pasteurizada, lo cual indicaría que MAP sería sensible al tratamiento térmico usado ($65^{\circ}\text{C}/20\text{min}$) sumado a los cambios bioquímicos que ocurren durante el proceso de maduración. Por otro lado, en los quesos elaborados con leche no pasteurizada, inoculada artificialmente, se aisló MAP durante la maduración y se observó que este proceso contribuiría lentamente a la disminución de su viabilidad. Una de las causas principales de la disminución en el número de bacterias por g observada en los primeros días de maduración podría deberse a la caída de la actividad de agua, aunque MAP fue aislada hasta los 60 días de maduración (Cirone *et al.*, 2006). Por el contrario, en el presente trabajo, en los QB MAP solo fue aislado hasta los 2 días y en los QA hasta los 15 días de almacenamiento refrigerado. A diferencia del trabajo

mencionado anteriormente donde los quesos se almacenaron a temperatura ambiente, los QB y QA fueron quesos blandos cuya prolongación de la vida útil necesita almacenamiento a 4°C, lo cual podría afectar negativamente la supervivencia de MAP. En ambos niveles de contaminación MAP no fue aislada en la muestra de leche tomada en el momento de la inoculación, pero luego si pudo observarse en los medios de cultivo correspondientes durante el proceso de elaboración. Esto podría sugerir una adaptación de la bacteria al medio y posterior desarrollo. Si bien hubo diferencias en la cantidad de UFC/g aisladas en ambos niveles de contaminación, estas fueron menores a las diferencias en los niveles de inoculación. Esta cantidad de UFC recuperadas disminuyó entre 2 y 3 órdenes logarítmicos con respecto a la cantidad de UFC inoculadas lo cual coincide con los resultados de leche presentados en el Capítulo I del presente reporte. Por otro lado, pudo observarse que el pH del producto no varió de forma sustancial durante la elaboración y almacenamiento por lo cual no puede relacionarse a los cambios en la supervivencia de MAP.

La aplicación de un tratamiento térmico (pasteurización) a la leche cruda previo a la elaboración tanto de yogur como de quesos sería altamente recomendable para eliminar su posible contaminación con MAP y obtener un alimento inocuo. Por otro lado, debería enfatizarse el control de PTBC en los sistemas sanitarios de los rodeos lecheros así como en industrias lácteas, con el objetivo de proteger a los consumidores contra el posible riesgo de infección con MAP u otras bacterias potencialmente patógenas.

CAPÍTULO III

Análisis de muestras de leche, quesos, yogures y agua

INTRODUCCIÓN

Muchos investigadores han demostrado que los animales enfermos de PTBC pueden excretar MAP en la leche que producen (Patel y Shah, 2011). Esta micobacteria ha sido vinculada a la enfermedad de Crohn en humanos y se ha sugerido que la principal vía de transmisión serían los alimentos contaminados, ya que MAP podría sobrevivir a los tratamientos térmicos (Grant, 2006; Slana *et al.*, 2008). Además se ha aislado a partir de leche comercial pasteurizada en Argentina, Brasil, India, Reino Unido, Estados Unidos y República Checa en un rango de positividad que se encuentra entre 0.3 y 67% (Paolicchi *et al.*, 2012; Carvalho *et al.*, 2012; Shankar *et al.*, 2010; Grant *et al.*, 2002a; Grant *et al.*, 2002b; Ellingson *et al.*, 2005; Ayele *et al.*, 2005). Otros trabajos fueron realizados para investigar la presencia de MAP en productos lácteos comerciales a través de cultivo y PCR como quesos, yogur y leche en polvo (Hruska *et al.*, 2005; Botsaris *et al.*, 2010; Shankar *et al.*, 2010).

La supervivencia de MAP a los tratamientos térmicos está asociada al número inicial de células presentes en la leche cruda. Esta micobacteria ha sido detectada luego de la pasteurización alta temperatura corto tiempo (HTST), si el número de bacterias viables era superior a 10^5 UFC/mL (Gao *et al.*, 2002). También esta supervivencia ha sido vinculada al hecho de que las células de MAP pueden estar formando agregados en la leche, por lo tanto, combinando la pasteurización con la homogenización se aumenta la efectividad del tratamiento térmico (Grant *et al.*, 2005; Patel y Shah, 2011; Hammer *et al.*, 2014).

Con respecto al análisis de los productos lácteos por PCR un resultado positivo no indica obligatoriamente la presencia de MAP u otras micobacterias viables, por lo tanto la mayoría de los trabajos publicados han detectado mayor porcentaje de positivos por PCR que por cultivo (Stabel *et al.*, 2002; Grant *et al.*, 2003; Reddacliff *et al.*, 2003; Gao *et al.*, 2005; Ayele *et al.*, 2005; Ellingson *et al.*, 2005).

Las características nutricionales que hacen de la leche un alimento completo para la dieta de los seres humanos, también la hacen un medio de cultivo ideal para el crecimiento de una gran variedad de microorganismos (Pinzón, 2006). Los productos lácteos y la leche pueden contaminarse con microorganismos patógenos o sus toxinas y provocar enfermedad en el consumidor. El número de bacterias presentes en el producto final refleja las condiciones sanitarias bajo las cuales la leche ha sido procesada y permite determinar su período de preservación y consumo. En la leche cruda se

encuentran microorganismos con diversas características metabólicas donde los grupos más importantes son las Bacterias Mesófilas Aerobias Totales (BAMT) las cuales conforman el grupo más amplio y su recuento se aplica como criterio de calidad en la leche cruda, utilizándose como base para las bonificaciones o sanciones. Es mal llamado Recuento Total de Bacterias, ya que muchos otros tipos de bacterias no quedan incluidas, porque sus rangos de temperatura óptima de crecimiento son diferentes o el oxígeno les es inhibitorio. Debido a que la lectura se realiza contando el número de colonias que aparece en la placa de Petri conteniendo medio de cultivo rico en nutrientes, como producto de la multiplicación a partir de una sola célula bacteriana o de un grupo de ellas, el resultado se expresa en UFC/mL. En algunos alimentos un recuento elevado de BAMT indica una pobre calidad. Los alimentos pueden tener una apariencia normal pero su recuento total en placa puede ser elevado, lo que indica que la alteración del producto final está muy cercana (Morton, 2001).

En un estudio realizado en Nueva Zelanda se encontró que la leche cruda contiene patógenos reconocidos como *Salmonella*, *E. coli* O157:H7, *Campylobacter* y *Listeria*, aunque la prevalencia de los mismos fue relativamente baja. Sin embargo esto refleja la continua necesidad de realizar una correcta pasteurización u otro tratamiento equivalente para la elaboración de productos lácteos seguros para el consumidor (Hill *et al.*, 2012).

Algunos brotes de ETAs han sido vinculados al consumo de leche comercial procesada bajo condiciones de pasteurización inadecuada, contaminada post-pasteurización o almacenada a temperaturas inadecuadas. Existen algunos análisis para chequear la correcta realización de la pasteurización. Uno de éstos es el test de fosfatasa alcalina (FA), enzima que se desactiva en el proceso térmico. La determinación de la desactivación de esta enzima es importante desde el punto de vista de la salud pública ya que si la pasteurización no fue correcta algunos patógenos pueden sobrevivir al tratamiento (Rampling *et al.*, 2004).

Según el Código Alimentario Argentino (CAA), la leche Ultrapasteurizada (UP) y la leche Ultra Alta Temperatura (UAT) deben responder, entre otras, a las siguientes exigencias: prueba de FA negativa en ambas, recuento de BAMT, menos de 1000 UFC/mL para las UP y menos de 10 UFC/mL para las UAT (CAA, 1992). En Argentina no existen registros de estudios realizados sobre muestras leche pasteurizada que evalúen la calidad higiénico sanitaria a través del recuento de BAMT.

Los objetivos del presente capítulo fueron a) identificar la presencia de MAP y otras micobacterias en leche, yogures y quesos comerciales mediante cultivo y PCR, b) evaluar la calidad de leche comercial a través de las técnicas de recuento de BAMT y prueba de FA y c) identificar MAP y otras micobacterias en leche cruda, filtro de tanque de enfriado y agua de bebederos de establecimientos lecheros.

DISEÑO EXPERIMENTAL: MATERIALES Y MÉTODOS

1. LECHE, YOGURES Y QUESOS COMERCIALES

1.1. Muestras

Durante 24 meses se evaluaron 384 muestras de leche comercializadas en cuenca lechera Mar y Sierras de Argentina. Se tomó al azar directamente desde la góndola de los comercios un envase de 1L de leche de cada categoría y se trasladó al laboratorio en forma refrigerada en el caso de las leches UP y a temperatura ambiente las UAT, hasta su posterior análisis. En la Tabla 6 se puede observar que fueron tomadas en total 24 muestras de cada categoría, teniendo en cuenta las siguientes variables: marca comercial (primera y segunda), tratamiento térmico (UP y UAT), contenido de grasa (entera y descremada) y época del año (otoño-invierno y primavera-verano).

Tabla 6: Cantidad y distribución de muestras de leche comercial

	1ª Marca				2ª Marca				TOTAL
	UAT		UP		UAT		UP		
	Ent	Desc	Ent	Desc	Ent	Desc	Ent	Desc	
Ot - Inv	24	24	24	24	24	24	24	24	192
Pri - Ver	24	24	24	24	24	24	24	24	192
TOTAL	48	384							

Ent: leche entera, **Desc:** leche descremada

También, durante 12 meses se evaluaron 24 muestras de yogur bebible y 24 muestras de quesos blandos comercializados en cuenca lechera Mar y Sierras de Argentina. Se tomó al azar directamente desde la góndola de los comercios un envase de 1L de yogur bebible y un pote de queso blando de cada categoría y se trasladó al laboratorio en forma refrigerada hasta su posterior análisis. Como muestra la Tabla 7, se tomaron en total 3 muestras de cada categoría, teniendo en

cuenta las siguientes variables: marca comercial (primera y segunda), contenido de grasa (entera y descremada) y época del año (otoño-invierno y primavera-verano).

Tabla 7: Cantidad y distribución de muestras de yogures y quesos comerciales

	1ª Marca		2ª Marca		TOTAL
	Ent	Desc	Ent	Desc	
Ot - Inv	3	3	3	3	12
Pri - Ver	3	3	3	3	12
TOTAL	6	6	6	6	24

Ent: yogur o queso entero, **Desc:** yogur o queso descremado

1.2. Identificación de MAP y otras micobacterias por cultivo

Se procesaron las muestras sin descontaminación química como fuera determinado previamente. De cada envase se tomaron 150 mL de leche y se centrifugaron (centrífuga Sorvall RC5CE, Newtown, USA) a 9400 rpm durante 15 min a 10°C. Se utilizó la capa grasa y el *pellet* para su procesamiento, descartando el sobrenadante. El *pellet* se resuspendió en 3 mL de PBS. Cuatro gotas se cultivaron en los siguientes medios de cultivo: Herrold, HEYM más piruvato (Sigma Chemical Co., St. Louis, Mo, USA.), HEYM más antibióticos (Vancomicina 0.01% p/v, Anfotericina B 5% p/v, Ácido Nalidíxico 0.3% p/v y Nistatina 0.01% p/v), Stonebrink y Löwenstein Jensen. Los medios fueron incubados a 37°C por 16 semanas. Se examinaron semanalmente para detectar la presencia de colonias MAP y otras micobacterias. Las colonias fueron analizadas microscópicamente mediante la coloración de ZN (OIE, 2011). Los recuentos se expresaron en UFC/mL de leche. Luego de transcurridas las 16 semanas, se realizó un barrido y posterior coloración de ZN sobre los cultivos negativos a micobacterias.

1.3. Identificación de MAP y otras micobacterias por PCR

1.3.1. Extracción de ADN por IMB

Para la identificación de MAP mediante PCR IS900 se tomó 1 mL de la suspensión obtenida en el punto 1.2 y fue entibiada a 50°C durante 15 minutos. Luego centrifugada a 7500 rpm a 4°C, durante 15 minutos en una centrífuga para microtubos (Hermle, Z233MK-2, Alemania). La grasa y suero de la leche fueron descartados y se trabajó sólo con el precipitado siguiendo el protocolo descrito para IMB y PCR IS900 descrito en los puntos 2.2.2 y 2.3.1.

1.3.2. Extracción de ADN kit comercial

Para la identificación de otras micobacterias mediante la amplificación PCR hsp65 se tomaron 300 µL de la suspensión obtenida en el punto 1.2 y se procedió con el protocolo descrito en el punto 2.3 (Capítulo I) según indicaciones del fabricante.

Para la realización de esta técnica las muestras fueron procesadas en *pool* conformados arbitrariamente de la siguiente manera:

- a) *Pool* de muestras ZN positivas: 150 µL de 2 muestras diferentes.
- b) *Pool* de muestras ZN negativas: 60 µL de 5 muestras diferentes.

1.4. Recuento de BAMT

Cada envase fue agitado manualmente y desinfectado por fuera con etanol 70%. Se tomó luego 1 mL de cada muestra para realizar el recuento de BAMT según la técnica descrita en la norma FIL-IDF 100B-1991 (FIL-IDF, 1991). Previo a la siembra, se realizaron 3 diluciones seriadas de la muestra (1:10, 1:100 y 1:1000) en agua de peptona al 5% (Oxoid, England). Seguidamente, se transfirió 1 mL de cada dilución, por duplicado, a placas de Petri estériles, donde se mezclaron con 10 mL de Plate Count Agar (Oxoid, England) fundido a 45°C. Una vez solidificado el agar, las placas se incubaron invertidas a 37°C por 48 ± 3 horas. Se realizó recuento en aquellas placas que presentaron entre 30 y 300 colonias. Se multiplicó el promedio del número de UFC de ambas placas correspondientes a una misma dilución, por la inversa de la dilución correspondiente, para obtener el número de UFC de BAMT que se desarrollan a partir de 1 mL de muestra. Teniendo en cuenta los límites establecidos por el CAA en los artículos 559tris y 560, la leche fue clasificada como “No

apta para consumo” cuando los recuentos de UFC superaron estos límites y “Apta para consumo”, cuando no fueron superados.

1.4.1. Identificación de otras bacterias aisladas

Se seleccionaron al azar, a partir de placas de cultivo de PCA utilizadas para los recuentos de BAMT, 3 colonias de bacterias que fueron repicadas y purificadas en Agar Sangre Columbia (Oxoid, England) para su posterior identificación a través de pruebas bioquímicas.

1.5. Fosfatasa alcalina

A la totalidad de las muestras se le realizó el test de FA utilizando un kit comercial (ALP 405, Weiner lab., Arg). Cinco mL de cada leche fueron centrifugadas y el suero separado para su posterior análisis, siguiendo las instrucciones del fabricante. Se utilizó como control positivo leche cruda extraída del ordeño de la mañana del tambo de la EEA INTA Balcarce, el mismo día en que se analizaron las muestras.

1.6. Análisis estadístico

Se realizó un análisis de comparaciones múltiples para evaluar la asociación entre cada factor o categoría y los recuentos de BAMT o sus respectivos logaritmos decimales, y entre cada factor y los ZN positivos obtenidos de los barridos de cultivos negativos a micobacterias mediante la test de Scheffé ($p < 0,01$), utilizando el programa de análisis estadístico Statistical Analysis Software (SAS, 1998).

2. LECHE, FILTROS Y AGUA DE ESTABLECIMIENTOS LECHEROS

Se tomaron muestras de leche de tanque de enfriado, filtros de la línea de ordeño y agua de bebederos de 9 tambos diferentes con y sin antecedentes de PTBC y TBC ubicados en distintas cuencas lecheras de la provincia de Buenos Aires (Tabla 8). Las muestras consistieron en 200 mL de leche del tanque y 200 mL agua de bebederos y filtro de la línea de leche del tanque de enfriado.

Tabla 8: Tipo de muestras tomadas en los diferentes tamos estudiados

Tambo	Tanque	Filtro	Agua
1	X	X	-
2	X	X	X
3	X	X	X
4	X	X	X
5	X	X	X
6	X	X	-
7	X	-	-
8	X	X	-
9	X	-	-

2.1. Procesamiento de las muestras

Se realizó cultivo para detección de MAP y otras micobacterias de las muestras tomadas según la metodología descrita en el punto 1.1.1, método del ácido oxálico (5% p/v). Las mismas muestras fueron procesadas para detección de MAP por PCR según la metodología descrita en el punto 2.1.2 y 2.3.1.

RESULTADOS

1. LECHE

1.1. Identificación de MAP y otras micobacterias por cultivo

La totalidad de las muestras resultaron negativas al cultivo de micobacterias. Sin embargo, cuando se realizó el frotis y coloración de ZN de los barridos de todos los tubos de medios de cultivo sembrados se encontró que el 40,1% (154/384) de las muestras resultaron positivas a ZN. Se consideró positiva una muestra cuando al menos uno de los cultivos sembrados fue positivo a ZN.

En la Tabla 9 se observa el número de muestras positivas y su respectivo porcentaje según categoría. Los valores mayores fueron observados para la leche segunda marca (23,17%), descremadas (18, 48%) y para las UAT (22,13%).

Con respecto al análisis estadístico de los datos obtenidos se obtuvieron diferencias significativas ($p < 0,01$) cuando se compararon con los distintos tratamientos térmicos, contenido de grasa y marcas comerciales, observándose mayor cantidad de muestras ZN positivas para las leches UAT, descremadas y de segunda marca. Las diferencias con respecto a los meses en los que fueron tomadas las muestras se muestran en la Figura 13, distintas letras corresponden a diferencias significativas entre meses ($p < 0,01$). Los meses en los cuales se observaron mayor número de muestras positivas fueron Julio y Octubre.

En la Figura 14 se muestra la distribución mensual de muestras positivas de manera similar a la Figura 1, pero los valores se encuentran subdivididos en las categorías UP y UAT. Puede observarse los mayores valores para la leche UAT todos los meses excepto para el mes de Diciembre en donde la leche UP tienen mayor cantidad de muestras ZN positivas.

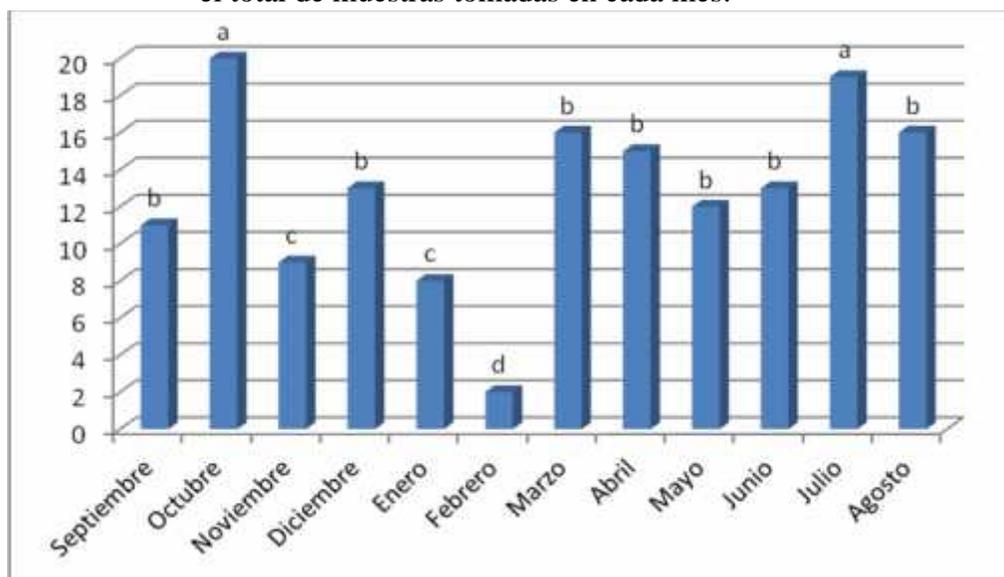
En la Figura 15 se muestran algunas de las microfotografías de las tinciones ZN realizadas sobre los barridos de cultivos negativos de muestras de leche comercial.

Tabla 9: Número de muestras y porcentaje (%) de leche comercial positivas a ZN.

	UAT		UP		total
	Ent	Desc	Ent	Desc	
1ra Marca	19 (4,94)	18 (4,68)	15 (3,90)	13 (3,38)	65 (16,92)
2da Marca	23 (5,98)	25 (6,51)	26 (6,77)	15 (3,90)	89 (23,17)
Subtotal	42 (10,93)	43 (11,19)	41 (10,67)	28 (7,29)	154 (40,10)
Total	85 (22,13)		69 (17,96)		154 (40,10)

Ent: leche entera, Desc: leche descremada

Figura 13: Número total de muestras de leche comercial positivas a ZN sobre el total de muestras tomadas en cada mes.



Letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0,05$) entre meses.

Figura 14: Número total de muestras de leche comercial (UAT y UP) positivas a ZN sobre el total de muestras tomadas en cada mes.

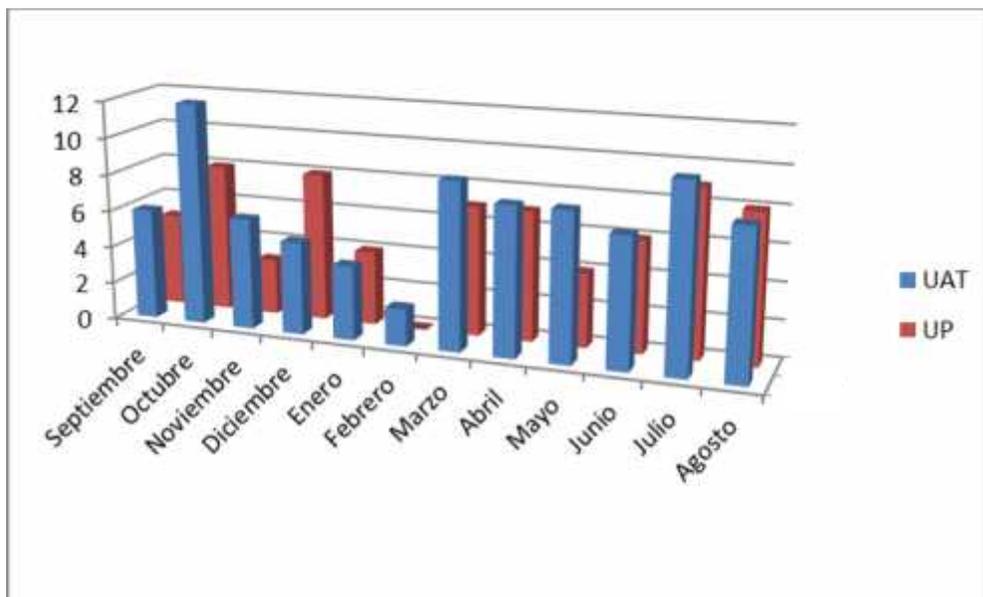
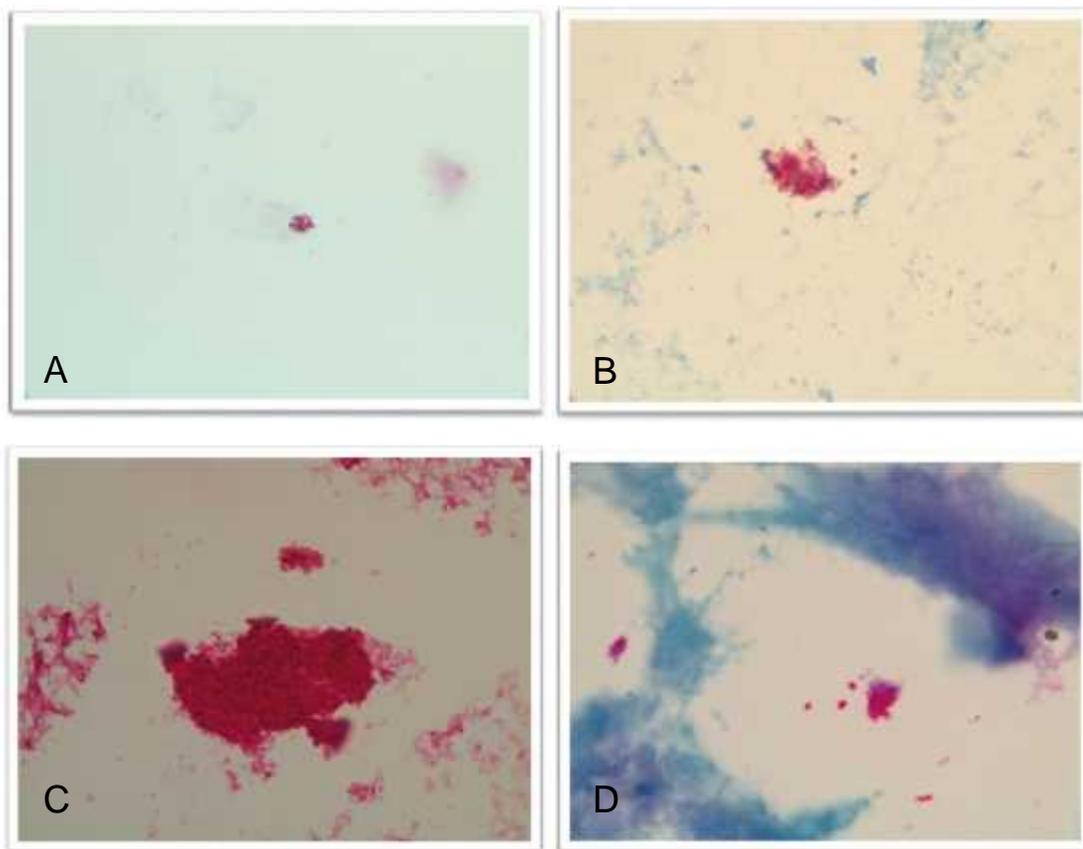


Figura 15: Tinción positiva a ZN realizada sobre los barridos de cultivos negativos de muestras de leche comercial. A: segunda marca, descremada, UAT, Septiembre, repetición 1; B: segunda marca, descremada, UAT, Septiembre, repetición 2; C: segunda marca, descremada, UP, Diciembre, repetición 1; D: segunda marca, entera, UAT, Agosto, repetición 1 (1000x).



La totalidad de los cultivos para detección de micobacterias resultaron negativas en las muestras de yogur y queso blando procesadas. En las Tablas 10 y 11 se muestran los resultados obtenidos para la coloración de ZN realizada a partir de los barridos de los cultivos negativos. Puede observarse que en ambos productos pertenecientes a segundas marcas fueron los que mostraron mayor cantidad de muestras ZN positivas.

Tabla 10: Número de muestras y porcentaje (%) de yogures Comerciales positivos a ZN.

	Ent	Desc	TOTAL
1ra marca	0	2 (8,33)	2 (8,33)
2da marca	2 (8,33)	1 (4,17)	3 (12,5)
Subtotal	2 (8,33)	3 (12,5)	5 (20,83)
TOTAL	5 (20,83)		

Ent: yogur entero, **Desc:** yogur descremado

Tabla 11: Número de muestras y porcentaje (%) de quesos comerciales positivos a ZN.

	Ent	Desc	TOTAL
1ra marca	1 (4,17)	0	1 (4,17)
2da marca	1 (4,17)	1 (4,17)	2 (8,33)
Subtotal	2 (8,33)	1 (4,17)	3 (12,5)
TOTAL	3 (12,5)		

Ent: queso entero, **Desc:** queso descremado

1.2. Identificación de MAP y otras micobacterias por PCR

1.2.1. Extracción de ADN por IMB

Se analizaron por esta técnica 384 muestras de leche comercial para detección de MAP por PCR, observándose sólo 6 muestras positivas del total (1,56%). Como se muestra en la Tabla 12, la mayor cantidad de muestras positivas pertenecen a la categoría primera marca comercial y fueron tomadas durante los meses de Octubre (n=1) y Noviembre (n=5).

En la Figura 16 pueden observarse las bandas correspondientes a 217pb para las muestras de leche positivas a MAP.

Tabla 12: Número de muestras y porcentaje (%) de leche comercial positivas a PCR para identificación de MAP.

	UAT		UP		total
	Ent	Desc	Ent	Desc	
1ra Marca	1 (0,26)	1 (0,26)	1 (0,26)	2 (0,52)	5 (1,3)
2da Marca	1 (0,26)	0	0	0	1 (0,26)
Subtotal	2 (0,52)	1 (0,26)	1 (0,26)	2 (0,52)	6 (1,56)
TOTAL	3 (0,78)		3 (0,78)		6 (1,56)

Ent: leche entera, Desc: leche descremada



Figura 16: Amplificación de ADN de MAP extraído a partir de muestras de leche comercial mediante IMB. Línea 1: marcador de peso (50 Marker, Promega), línea 2: control positivo (ADN de MAP), línea 3: control negativo, línea 4: primera marca, descremada UP octubre repetición 2, línea 5: primera marca descremada UP repetición 1, línea 6: primera marca entera UP repetición 2, línea 7: primera marca descremada UAT repetición 2, línea 8: primera marca entera UAT repetición 3, línea 9: segunda marca entera UP repetición 1, línea 10: segunda marca Entera UAT repetición 3.

Las muestras de ADN extraídas a partir de muestras de yogures y quesos comerciales resultaron negativas en su totalidad. Estos resultados no fueron sometidos a análisis estadístico debido a la baja cantidad de muestras positivas.

1.2.2. Extracción de ADN kit comercial

Las muestras de ADN extraídas por esta metodología fueron amplificadas para detección del gen hsp65, resultando negativas en su totalidad (n=384). De igual manera, las muestras de ADN extraídas a partir de yogures y quesos comerciales resultaron negativas en su totalidad.

1.3. Recuento de BAMT

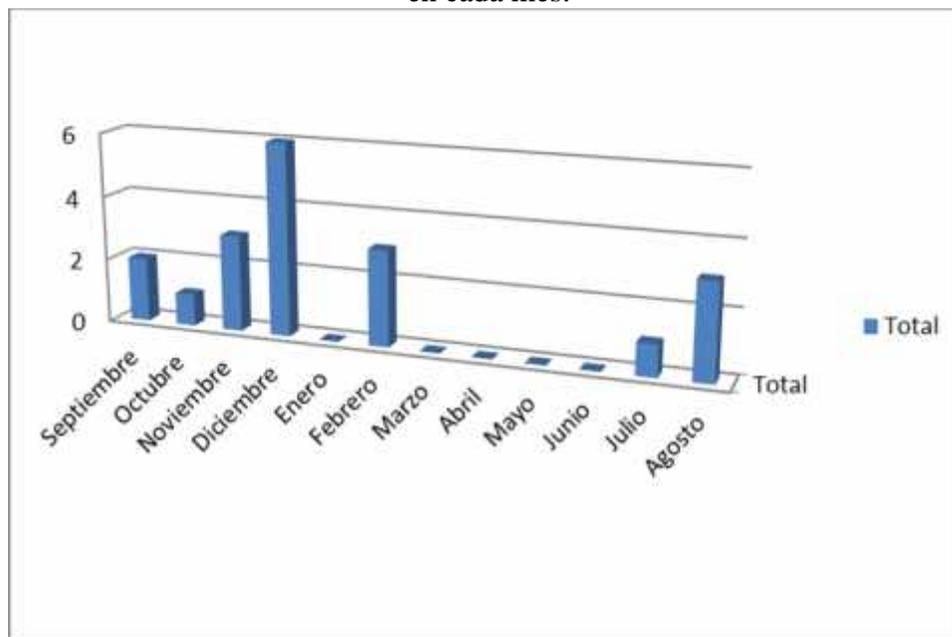
En la Tabla 13 se muestran los resultados de los recuentos de BAMT, expresados en cantidad de muestras de leche (y porcentaje) que superaron los límites establecidos por el CAA, las cuales fueron clasificadas como “No apta para consumo” De las 384 muestras, 19 (4,95%) fueron no aptas para consumo. De estas, 16 (4,16%) fueron leches UP. También, teniendo en cuenta la totalidad de no aptas para consumo, 18 (4,68%) muestras correspondieron las leches determinadas como de segunda marca comercial. Con respecto a la época del año, como se muestra en la Figura 17, pudo observarse que durante el mes de Diciembre se registró la mayor cantidad de muestras que superaron los límites que establece el CAA. También en los meses de Noviembre, Febrero y Agosto se observaron altos recuentos de BAMT.

Tabla 13: Número de muestras y porcentaje (%) de leche comercial que superan los límites establecidos por el CAA.

	UAT		UP		TOTAL
	Ent	Desc	Ent	Desc	
1ra Marca	0	1 (0,26)	0	0	1 (0,26)
2da Marca	1 (0,26)	1 (0,26)	6 (1,56)	10 (2,60)	18 (4,68)
subtotal	1 (0,26)	2 (0,52)	6 (1,56)	10 (2,60)	19 (4,95)
TOTAL	3 (0,78)		16 (4,16)		19 (4,95)

Ent: leche entera, Desc: leche descremada

Figura 17: Número total de muestras de leche comercial que superan los límites establecidos por el CAA sobre el total de muestras tomadas en cada mes.



1.3.1. Identificación de otras bacterias aisladas

De la totalidad de colonias extraídas a partir de las placas de recuentos sólo 7 pudieron ser identificadas como pertenecientes a la Flia. Enterobacteriaceae y a los siguientes géneros: *Staphylococcus sp.*, *Flavobacterium sp.*, *Aeromonas sp.*, *Bacillus sp.*, *Kurthia sp.*

1.4. Fosfatasa alcalina

La totalidad (100%) de las muestras resultaron negativas al test de fosfatasa alcalina.

1.5. Análisis estadístico

Al comparar el log de los recuentos de BAMT con los meses en los cuales fueron tomadas las muestras mediante un análisis por Chi cuadrado, se puede observar que las diferencias son significativas ($p < 0.01$), por lo tanto existen diferencias entre meses con respecto a los recuentos de BAMT.

Se realizaron las comparaciones pareadas tanto de los recuentos de BAMT como de los log de los mismos con respecto a los meses resultando no significativas en todos los casos ($p < 0.01$). También se compararon estos valores con respecto a los distintos tratamientos térmicos obteniéndose diferencias significativas ($p < 0.01$). En ambos casos en la leche UP se obtuvieron recuentos mayores. Al comparar las medias de los recuentos y los log de los mismos obtenidos a partir de las muestras con distinto contenido de grasa (enteras vs descremadas) resultaron iguales, no hubo diferencias significativas ($p < 0.01$), pero sí se obtuvieron diferencias significativas al compararlos con las distintas marcas comerciales utilizadas en el ensayo ($p < 0.01$). Los mayores recuentos se observaron para la marca A.

3. LECHE, FILTROS Y AGUA DE ESTABLECIMIENTOS LECHEROS

Solo se aisló MAP a partir de la muestra de filtro obtenida en el tambo 1 (14,28%). La totalidad de los cultivos de leche de tanque y agua resultaron negativos a MAP. En el tambo 3, se aislaron micobacterias atípicas tanto de la leche del tanque como del filtro, tipificadas por técnicas de biología molecular (Secuenciación) como *Mycobacterium porcinum*.

La amplificación del IS900 por PCR resultó negativa en la totalidad de las muestras.

DISCUSIÓN

En el presente trabajo todos los cultivos fueron negativos lo cual podría indicar que no existieron micobacterias viables en el producto final seleccionado para este trabajo. Este resultado marca una diferencia a lo hallado en otros trabajos donde lograron aislar MAP a partir de leche comercial pasteurizada y de otros productos lácteos (Paolicchi *et al.*, 2012; Grant *et al.*, 2002a; Grant *et al.*, 2002b; Ellingson *et al.*, 2005; Ayele *et al.*, 2005; Shankar *et al.*, 2010; Hruska *et al.*, 2005, Carvalho *et al.*, 2012). Esto podría deberse la baja sensibilidad relativa de la técnica de cultivo utilizada cuyo límite de detección es igual a 10^3 UFC/mL, con lo cual aquellas muestras cuya carga de micobacterias es menor resultarían negativas al cultivo. Una de las posibles explicaciones de los resultados negativos al cultivo para identificación de MAP en estos productos, es que esta micobacteria se encuentra formando agregados y no está uniformemente distribuida en la leche (Grant *et al.*, 2002c). Además podrían existir diferencias entre cepas, el efecto de los agentes descontaminantes sobre la viabilidad de MAP y la interferencia de microorganismos de la flora contaminante que podría competir con MAP durante la incubación, entre otros (Dundee *et al.*, 2001; O'Reilly *et al.*, 2004, Carvalho *et al.*, 2012). Todos estos factores podrían contribuir a obtener en los cultivos resultados falsos negativos. Por otro lado, la pasteurización probablemente elimine muchas de las micobacterias viables o reduzca su número por debajo del límite de detección de la técnica de cultivo. Si bien la prevalencia de PTBC en muchos establecimientos lecheros podría ser baja la gran mayoría de los tambos poseen animales enfermos que excretan MAP al medio ambiente, contaminándolo. Sin embargo, la leche puede provenir de animales infectados pero que en ese momento del ordeño no estuviesen eliminando micobacterias ya que la excreción en leche es intermitente.

La reacción de PCR para identificación de MAP resultó positiva en 1,56% (6/384) de las muestras de leche y negativa para la totalidad de muestras de yogur y quesos comerciales. En el caso de la leche estos resultados son sensiblemente mas bajos que el resto de la bibliografía donde se ha detectado MAP por PCR en distintos países entre un 3,6 y 15,5% (Anzabi y Hanifian., 2012; Carvalho *et al.*, 2009; Gao *et al.*, 2002; Grant *et al.*, 2002; Millar *et al.*, 1996). Entre los mencionados trabajos, dos de ellos obtuvieron resultados similares a los de la presente investigación, los cuales detectaron MAP por PCR pero no lograron aislarlo mediante de cultivo. En el más reciente de ellos, realizado sobre leche comercial en Irán, detectaron un 10,7% de muestras positivas

a PCR (Anzabi y Hanifian, 2012). En el segundo mencionado, realizado sobre leche comercial en Reino Unido, los autores detectaron MAP por PCR en un 7,05% de las muestras (Millar *et al.*, 1996).

En cuanto a las muestras de quesos y yogures comerciales, si bien el número de muestras fue bajo, no se detectó MAP u otras micobacterias por ninguna de las dos metodologías utilizadas. En otros trabajos similares realizados en quesos comerciales, se detectó MAP por PCR entre un 4 y un 50% de las muestras (Ikonopoulou *et al.*, 2005; Clark *et al.*, 2006; Stephan *et al.*, 2007; Farias *et al.*, 2014), y en dos de ellos los autores lograron aislar MAP por cultivo entre un 3-4% de los quesos comerciales (Ikonopoulou *et al.*, 2005; Farias *et al.*, 2014). La búsqueda de MAP en yogur solo fue realizada por Shankar *et al.* (2010). Estos investigadores lograron aislar MAP a partir de 5/9 (56%) muestras, resultados que no coinciden con los del presente trabajo donde MAP no fue detectada.

Los resultados positivos a la coloración de ZN realizada sobre frotis sobre los cultivos negativos podrían indicar la presencia de micobacterias en las muestras de los productos lácteos analizados. La tinción de ZN positiva podría deberse a que la injuria que soportan las micobacterias durante la pasteurización modifique la estructura de la pared celular micobacteriana y se encuentren en un estado sub-lethal (Grant *et al.*, 2002b). Sin embargo, los resultados de la técnica de PCR fueron negativos para detección del gen *hsp65*, lo cual estaría indicando la ausencia de micobacterias en estos productos y en estos casos la presencia de formas ácido resistentes podría provenir de los componentes del medio de cultivo o de restos del material utilizado para la siembra (ej: materia grasa).

La prueba de FA resultó negativa en el 100% de las muestras, lo cual asegura una pasteurización correcta, ya que esta enzima se desactiva cuando la temperatura alcanza los niveles requeridos durante este proceso (Rampling *et al.*, 2004; Rankin *et al.*, 2010; Wilinska *et al.*, 2007).

En cuanto a los recuentos de BAMT, en el presente trabajo se halló que un 4,95% de las muestras de leche superan los límites que establece el CAA (CAA, 1992). Este porcentaje de leche comercializada podría ser elaborada y conservada en forma incorrecta y no es apto para consumo humano.

Al igual que para los resultados de las coloraciones de ZN, el análisis estadístico de los recuentos de BAMT se realizó para evaluar la asociación de las distintas categorías de los factores

seleccionados sobre estos recuentos. En cuanto a los meses del año, se encontraron diferencias significativas ($p < 0.01$), aunque este hecho no pudo asociarse a algún factor de producción o elaboración y almacenamiento, ya que las muestras a pesar de ser tomadas en el mes analizado, tenían fechas de elaboración muy variadas. Las diferencias encontradas entre los distintos tratamientos térmicos analizados fueron significativas, observándose que la leche UP tienen mayores recuentos que las UAT, lo cual es esperable debido a que este último tratamiento incluye en su procesamiento el envasado estéril del producto evitando la contaminación y proliferación bacteriana.

También se compararon los distintos niveles de marcas comerciales, encontrándose que la segunda marca significativamente tiene recuentos de BAMT superiores a la leche de primera marca. Estos resultados coinciden con lo publicado por Freitas *et al.* (2009) quien evaluó recuentos de BAMT en leches comercializadas en Brasil, encontrando que las marcas de menor calidad poseen mayores recuentos. Este hecho probablemente se deba a la menor calidad de las materias primas o a condiciones deficientes de elaboración.

Las bacterias identificadas en los productos lácteos estudiados (Flia. Enterobacteriaceae, *Staphylococcus sp.*, *Flavobacterium sp.*, *Aeromonas sp.*, *Bacillus sp.*, *Kurthia sp.*) pertenecen a microorganismos ambientales, lo cual refuerza la idea de que la contaminación de las muestras sería originada durante la elaboración y almacenamiento de los productos.

El incremento de brotes de ETAs asociados a productos lácteos resalta la importancia del control microbiológico en la industria láctea (Vasavada *et al.*, 1993). Deberían enfatizarse las medidas de control en cuanto a higiene, cadena de frío y otros métodos de control, tanto en industrias lácteas como en los puntos de venta para asegurar la calidad de los productos que llegan al consumidor.

DISCUSIÓN GENERAL

La leche es un medio rico en nutrientes que favorece el crecimiento de microorganismos, es por ello que la leche cruda puede ser una fuente importante de bacterias patógenas para el humano (Freitas *et al.*, 2009). MAP podría transmitirse a las personas a través de la leche ya que sería capaz de resistir los procesos de pasteurización tradicionales (Grant *et al.*, 2002a). Además ha sido detectada en agua potable (Aboagye y Rowe, 2011), en suelo (Whittington *et al.*, 2003), en productos lácteos; como leche fluida (Grant *et al.*, 2002b; Grant *et al.*, 2002c; Ellingson *et al.*, 2005; Paolicchi *et al.*, 2012), leche en polvo infantil (Hruska *et al.*, 2005), quesos (Ikononopoulos *et al.*, 2005); en productos cárnicos (Alonso-Hearn *et al.*, 2009, Vecchiarelli *et al.*, 2010) y en verduras y frutas (Pavlik *et al.*, 2009). La presencia de MAP en este amplio espectro de sustratos se debe a su capacidad para sobrevivir en condiciones extremas tales como pH bajo, ambiente del tracto gastrointestinal (Pavlik *et al.*, 2000), altas temperaturas durante pasteurización (Grant *et al.*, 2002a), o bajas temperaturas durante el almacenamiento (van Brandt *et al.*, 2011a).

En las últimas décadas se han descrito varios métodos para la detección, aislamiento e identificación de MAP en leche. El método más frecuentemente utilizado de detección de MAP es el cultivo y en segundo lugar, la PCR (simple, anidada, PCR en tiempo real) (Slana *et al.*, 2008). La preparación de las muestras para el análisis es un paso crítico en estas metodologías (Dundee *et al.*, 2001; Grant y Rowe, 2004; O'Reilly *et al.*, 2004; Gao *et al.*, 2005; Slana *et al.*, 2008). Un procedimiento básico incluye una centrifugación para recoger la fracción que sedimenta o *pellet*, luego una descontaminación química, y posterior procesamiento de las muestras por algún método de detección (cultivo, PCR, etc.). En el presente trabajo, se observó que la mayor cantidad de células viables de MAP quedan retenidas en la fracción grasa luego del centrifugado a altas revoluciones y baja temperatura de muestras de leche. Esto podría deberse a las características de la pared celular de las micobacterias y a su alto contenido de lípidos (McGee y Ward, 2012; Pyrgiotakis *et al.*, 2014). Es por ello, que al igual que lo afirmado en otras investigaciones (Grant *et al.*, 2002b; Gao *et al.*, 2005; Gao *et al.*, 2009) para la posterior descontaminación de las muestras de leche, una vez centrifugadas solo debería descartarse el sobrenadante, conservando el *pellet* y la capa grasa para su procesamiento.

El límite de detección de la metodología de cultivo convencional es alto ya que requiere un paso de descontaminación química agresivo y siembra en medios de cultivo selectivos (Botsaris *et al.*, 2010). En el presente estudio se calculó el límite de detección 10^3 UFC/mL de leche para cruda o pasteurizada (método de ácido oxálico y método sin decontaminar,

respectivamente). El método de HPC al 0,75% (p/v), utilizado en este trabajo para la descontaminación de leche cruda, evidenció un límite mayor que el obtenido para el método del ácido oxálico al 5% (p/v). El HPC es el más utilizado de las sustancias descontaminantes por ser el menos dañino para MAP y el más eficiente para eliminar la flora contaminante (Dundee *et al.*, 2001; Slana *et al.*, 2008; Bradner *et al.*, 2013). Una investigación reciente demostró que el HPC puede dañar las células de MAP viables, haciéndolas más susceptibles a la acción de antibióticos a los cuales son normalmente resistentes, como la vancomicina (Bradner *et al.*, 2013). En el presente ensayo, el ácido oxálico demostró ser menos agresivo para MAP que el HPC y además, la metodología es menos laboriosa y más rápida de realizar. Con respecto a la leche pasteurizada no sería necesario el paso de descontaminación, tal como lo afirman otras investigaciones ya que la flora contaminante sería eliminada por el tratamiento térmico (O'Reilly *et al.*, 2004; Grant *et al.*, 2005; Ellingson *et al.*, 2005).

En el presente trabajo se utilizó para todos los cultivos, tanto de leche como de productos lácteos, el medio HEYM con o sin el agregado de antibióticos. Este medio es el más utilizado para el aislamiento de MAP, aunque en otras investigaciones se han utilizado medios líquidos que aceleran la detección de MAP como BACTEC o MGIT (Grant y Rowe, 2004; Bradner *et al.*, 2013) pero para su uso es necesario contar con equipamiento especializado.

A pesar de los resultados obtenidos, si la concentración de MAP en la leche es baja, el uso de estas metodologías sería una limitante para su detección, debiendo poner énfasis en la modificación de las mismas para mejorar el límite de detección de MAP, probando distintas concentraciones y tipos de descontaminantes como así también diferentes medios de cultivos específicos.

El aislamiento de MAP y su identificación basada en sus características fenotípicas en los medios de cultivo, siguen siendo consideradas como “estándar de oro” para la caracterización de esta micobacteria (Manning y Collins, 2001; Taylor *et al.*, 2001). Pero debido a que la metodología de cultivo insume mucho tiempo está siendo reemplazada por técnicas moleculares (Hosek *et al.*, 2006). La PCR para detección de MAP y otras micobacterias a partir de muestras de leche es un método rápido de detección, pero también presenta una baja sensibilidad (23%) por la presencia de sustancias inhibitoras de la reacción normalmente presentes en la leche, como la grasa y el calcio, entre otras (Grant *et al.*; 2000; Khare *et al.*, 2004).

La selección de un adecuado método de extracción de ADN de micobacterias a partir de diferentes tipos de muestras, es esencial para obtener resultados confiables cuando se utilizan técnicas moleculares para su identificación (Hosek *et al.*, 2006).

Varios estudios han sido realizados para determinar metodologías de extracción de ADN de micobacterias a partir de muestras de leche (Grant *et al.*, 1998; Odumeru *et al.*, 2001; Antognoli *et al.*, 2001; Jayarao *et al.*, 2004; Khare *et al.*, 2004; Gao *et al.*, 2007; Gilardoni, 2012). En cuanto a la preparación de la muestra, estas investigaciones demostraron que luego del centrifugado inicial usando la capa grasa así como también el *pellet*, aumenta la sensibilidad de la posterior detección por PCR. Esto es debido a la alta afinidad de la superficie de las micobacterias a los lípidos (Hosek *et al.*, 2006). De acuerdo a lo afirmado en la bibliografía y a los resultados obtenidos en los ensayos para determinación de protocolos de descontaminación de muestras de leche para cultivo, en la presente investigación se determinó el límite de detección de tres metodologías de extracción de ADN utilizando tanto el *pellet* y la capa grasa. Las metodologías determinadas como más eficientes fueron la utilización de kit comercial y la utilización de IMB, siendo la técnica que utiliza alcoholes como fenol y cloroformo (van Embden *et al.*, 1992) la que mostró menor sensibilidad y mayor tiempo de procesamiento de las muestras. La utilización de IMB tiene como principal ventaja la capacidad de concentrar las micobacterias específicas presentes en la muestra, aumentando las posibilidades de su detección (Grant *et al.*, 1998; Antognoli *et al.*, 2001; Gilardoni, 2012). La extracción de ADN mediante kit comercial y la concentración de MAP a través del uso de IMB, fueron las técnicas seleccionadas en el presente trabajo para analizar las muestras de leche y productos lácteos comerciales.

MAP tiene la capacidad de sobrevivir en un amplio espectro de sustratos (Klanicova *et al.*, 2012). En este estudio se evaluó esta supervivencia en dos productos lácteos de bajo pH, como son quesos y yogures, ya que ha sido demostrado que MAP es capaz de sobrevivir a bajo pH (Pavlik *et al.*, 2000). Sung y Collins (2003) probaron la supervivencia de MAP a diferentes niveles de pH *in vitro* y llegaron a la conclusión de que este microorganismo es resistente a las condiciones ácidas. Además demostraron que en estas condiciones MAP expresa una proteína específica y modifica su fisiología de crecimiento dependiendo de la composición del medio de cultivo.

La viabilidad de MAP en leche productos lácteos fermentados como el yogur, no sólo dependen del efecto de la pasteurización de la leche, sino también de los cultivos *starter* utilizados en la elaboración (bacterias del ácido láctico) y de las condiciones de pH durante la fermentación (Donaghy *et al.*, 2004). Las bacterias del ácido láctico producen compuestos como ácidos orgánicos, peróxido de hidrógeno, diacetil y bacteriocinas que inhiben el crecimiento de la microflora contaminante y otros patógenos como *Staphylococcus aureus*, *Clostridium botulinum*, y *L. monocytogenes* (Nettles y Barefoot, 1993). El primer trabajo de investigación

para evaluar la supervivencia de MAP en yogur fue llevado a cabo por van Brandt *et al.* (2011a), quienes elaboraron yogur (pH 4.5) a partir de leche inoculada artificialmente. Estos investigadores observaron una reducción de 2 log aproximadamente en las UFC de MAP y concluyeron que esta disminución podría deberse a la inhibición por los cultivos probióticos y al bajo pH final del producto. A diferencia del presente trabajo, no evaluaron el comportamiento de esta micobacteria durante la preparación del yogur. El curso apropiado de este proceso es esencial porque el producto final está destinado al consumo inmediato y por lo tanto la reducción de la viabilidad de MAP durante el almacenamiento no proporcionaría seguridad a los consumidores (Klanicova *et al.*, 2012).

En la presente investigación MAP no fue aislado durante la preparación del yogur a diferencia de lo afirmado por Klanicova *et al.* (2012) en un trabajo donde los recuentos no variaron durante esta la etapa de fermentación. Esto sugiere que la caída del pH durante la elaboración podría afectar la viabilidad de MAP, evitando su desarrollo. Luego, durante el almacenamiento a 4°C, MAP fue aislado hasta el final del período aunque su viabilidad fue cayendo suavemente. Estos resultados coinciden con el estudio realizado por Klanicova *et al.* (2012), quienes después de seis semanas de almacenamiento a 4°C, observaron una disminución en los recuentos de MAP atribuyendo este hecho al efecto de las bacterias del ácido láctico (Maisnier-Patin *et al.*, 1992). Varias publicaciones han demostrado la capacidad inhibitoria de *Lactobacillus spp*, una de las cepas utilizadas como cultivo *starter* para la elaboración del yogur, sobre otras bacterias presentes en el producto causada por la producción de ácido láctico, bacteriocinas y otros compuestos (Nemeth *et al.*, 1996; Uraz *et al.*, 2001; Alisma *et al.*, 2004).

Los resultados de esta tesis indican que la viabilidad de MAP podría ser afectada negativamente durante la fermentación y almacenamiento refrigerado de yogur por acción de las bacterias del ácido láctico y sus metabolitos (bacteriocinas) y el descenso del pH. Esta micobacteria podría sobrevivir a la elaboración y almacenamiento durante al menos 20 días cuando está presente en la leche cruda en concentraciones elevadas, pudiendo representar un riesgo para los consumidores.

Este mismo efecto de la proliferación de bacterias del ácido láctico y descenso del pH sobre MAP ha sido estudiado durante la elaboración y almacenamiento de quesos.

Las micobacterias se caracterizan por su lento crecimiento, pudiendo sobrevivir largos períodos en diferentes ambientes (Brennan y Nikaido, 1995; Gonzalez-Merchand *et al.*, 1997). Así también pueden sobrevivir al almacenamiento refrigerado de quesos pero no necesariamente aumentan sus recuentos durante el mismo (Badr *et al.*, 2011). En el presente trabajo se evaluó la

supervivencia de MAP al proceso de elaboración y almacenamiento de quesos elaborados con leche artificialmente inoculada, aislándose en los quesos inoculados con baja concentración de MAP hasta los 2 días y en los quesos inoculados con alta concentración, hasta los 15 días de almacenamiento refrigerado, lo cual podría afectar negativamente la supervivencia de MAP. La cantidad de UFC/g de MAP recuperadas disminuyó entre 2 y 3 órdenes logarítmicos con respecto a la cantidad de células inoculadas, lo cual pudo deberse a la metodología de descontaminación utilizada, que daña las células viables de MAP, dificultando su recuperación. El queso, al igual que otros productos lácteos, contiene la microflora de los cultivos *starter* en forma viable la cual puede proliferar en los medios de cultivo haciendo necesario un paso de descontaminación para el aislamiento de MAP (Donaghy *et al.*, 2003). Spahr y Schafroth (2001) observaron una pérdida del 60% de las UFC de MAP inoculadas en muestras queso Suizo descontaminadas, comparándolas con muestras sin descontaminar. Otros investigadores evidenciaron que utilizando otros medios de cultivo, como BACTEC (Sung y Collins, 2000) o Dubos suplementado con antibióticos (Giese y Ahrens, 1999), podría omitirse el paso de descontaminación. Dado que es probable que el número de células de MAP presentes en la leche infectada naturalmente sea bajo o se encuentren dañadas por el proceso de pasteurización, su recuperación a partir de muestras de queso podría ser negativamente afectada por la inclusión de este paso en el procesamiento (Donaghy *et al.*, 2003).

La aplicación de un tratamiento térmico a la leche cruda previo a la elaboración tanto de yogur como de quesos sería deseable con el fin de obtener un alimento inocuo. Por otro lado, debería enfatizarse el control de PTBC en los sistemas sanitarios de los rodeos lecheros así como en industrias lácteas, con el objetivo de proteger a los consumidores contra el posible riesgo de infección con MAP u otras bacterias potencialmente patógenas.

A diferencia de lo hallado en otras publicaciones donde lograron aislar MAP a partir de leche comercial pasteurizada y otros productos lácteos, confirmando que los humanos pueden estar expuestos a este patógeno a través de estos productos, (Paolicchi *et al.*, 2012; Grant *et al.*, 2002a; Grant *et al.*, 2002b; Ellingson *et al.*, 2005; Ayele *et al.*, 2005; Shankar *et al.*, 2010; Hruska *et al.*, 2005, Carvalho *et al.*, 2012; O'Doherty *et al.*, 2002), en el presente trabajo todos los cultivos fueron negativos lo cual indicaría que no existen micobacterias viables en altas concentraciones en el producto final.

El número de células viables de MAP que son eliminadas durante la pasteurización industrial de la leche sigue siendo controversial (Serraino *et al.*, 2014). Experimentos realizados a escala industrial observaron una reducción de 4-7 log en las UFC/mL de MAP (Pearce *et al.*, 2001;

Stabel y Lambertz, 2004; Grant *et al.*, 2005; McDonald *et al.*, 2005; Rademaker *et al.*, 2007; Lynch *et al.*, 2007). La incompleta inactivación de MAP durante de la pasteurización, sería el resultado de la formación de agregados o “clumps” de micobacterias, los cuales protegerían eficazmente algunos de los organismos de la efectos de la aplicación de calor durante el tratamiento térmico (Grant, 2006). Los pasteurizadores comerciales, imparten un flujo turbulento sobre la leche lo cual evitaría la formación de estos agregados aumentando las posibilidades de inactivación de células viables de MAP (Patel y Shah, 2011), determinando posibles resultados negativos cuando la leche es cultivada para la identificación de esta bacteria, como es el caso de esta investigación. En un estudio realizado también en Argentina por nuestro grupo de investigación en el cual se cultivaron 70 muestras de leche comercial durante el año 2003-04, se aisló MAP en dos de ellas (2,86%) (Paolicchi *et al.*, 2012). Estas diferencias en los resultados de ambas investigaciones podrían ser explicadas por la mejora de los tratamientos térmicos industriales y de la calidad de la materia prima.

Sin embargo, MAP fue detectada por PCR en 1,56% de las muestras de leche estudiadas en el presente trabajo. Estos resultados positivos a la PCR son coincidentes con el resto de la bibliografía donde se detectó ADN de MAP en distintos países entre un 3,6 y 15,5% (Millar *et al.*, 1996; Gao *et al.*, 2002; Grant *et al.*, 2002; Carvalho *et al.*, 2009; Anzabi y Hanifian, 2012). Entre los mencionados reportes, dos de ellos obtuvieron resultados similares a los de este estudio, los cuales detectaron MAP por PCR pero no lograron aislarlo mediante la metodología de cultivo (Millar *et al.*, 1996; Anzabi y Hanifian, 2012). Estos resultados indican que la leche que se comercializa podría provenir de establecimientos lecheros con PTBC, aunque la concentración de MAP en el producto final sea baja o que la pasteurización fue suficiente para eliminar las células viables presentes.

En cuanto a las muestras de quesos y yogures comerciales analizadas la totalidad resultaron negativas a las técnicas de cultivo y PCR para identificación de MAP y otras micobacterias.

Varias investigaciones se han realizado con el objetivo de identificar MAP viables en quesos comerciales (Ikonopoulou *et al.*, 2005; Clark *et al.*, 2006, Stephan *et al.*, 2007, Farias *et al.*, 2014) pero solo Ikonopoulou *et al.* (2005) y Farias *et al.* (2014), lograron aislar esta micobacteria. Los autores del primer trabajo mencionado tomaron 84 muestras de queso de distintos tipos, hallando MAP por cultivo en un 3.6% de las muestras y por PCR, en un 31,7% (Ikonopoulou *et al.*, 2005). Mientras que en la segunda investigación, se tomaron 30 muestras de una variedad de queso comercializada en la región (Coelho), detectándose MAP viables en una de las muestras (3.3%) y por PCR en un 10% (Farias *et al.*, 2014). En otras publicaciones se

detectó ADN de MAP por PCR entre un 4 y un 50% de las muestras, a pesar de no obtener cultivos positivos (Clark *et al.*, 2006, Stephan *et al.*, 2007). En cuanto a yogures comerciales, sólo existe una investigación realizada por Shankar *et al.* (2010) en la cual los autores lograron aislar MAP a partir de 5/9 (56%) muestras. Los resultados negativos de los cultivos obtenidos en este estudio podrían ser explicados por la técnica de descontaminación utilizada que disminuye aproximadamente 3 órdenes logarítmicos la cantidad de células viables de MAP presentes en la muestra.

Tanto en las leches como en los productos lácteos comerciales analizados, se observó un alto porcentaje de frotis ZN positivos que fueron realizados sobre los cultivos negativos. Esto podría indicar que las micobacterias presentes se encuentren en un estado sub-letal provocado por los tratamientos térmicos y por lo tanto, sean incapaces de desarrollar en los medios de cultivo utilizados como fue descrito por Grant *et al.* (2002b). Los resultados negativos de la PCR para identificación de género *Mycobacterium* realizado sobre las muestras de leche, podrían ser explicados por el límite de detección de la técnica que es igual a 10^5 UFC/mL, por lo tanto si la concentración de micobacterias es menor, la técnica de PCR utilizada, no las identificaría.

En cuanto a las muestras de leche y filtro de tanque y aguas de bebederos de los tambos analizados en este estudio, el hallazgo de importancia fue el aislamiento de MAP y de una micobacteria atípica como es *M. porcinum*. Estas micobacterias fueron aisladas a partir de muestras de filtro de la línea de leche de dos tambos diferentes, ambos con antecedentes de PTBC.

El filtro de la línea de leche, que se encuentra antes de su entrada al tanque, retiene restos de materia fecal y otras partículas contaminantes. Tiene una capacidad limitada y debe ser renovado luego del procesamiento de 1500 litros de leche o al final del ordeño. El análisis de este dispositivo podría ser considerado de valor diagnóstico para la detección de rodeos positivos a PTBC (El-Sayed *et al.*, 2013). Otras investigaciones han sido realizadas para identificar MAP en filtros de tanque de tambos en distintos países (McKee *et al.*, 2002; Cirone *et al.*, 2005, Cashman *et al.*, 2008; Slana *et al.*, 2011; El-Sayed *et al.*, 2013). McKee *et al.* (2002) se analizaron 186 filtros de leche por cultivo y PCR, hallando un 4,8% de positivos por cultivo y un 8,1% de positivos a PCR. Cashman *et al.* (2008) encontraron un 20% de filtros positivos a MAP cuando examinaron 59 rodeos lecheros de Irlanda. En otro estudio realizado en República Checa, se estudiaron 79 filtros encontrándose un alto porcentaje de positividad a la PCR (79,7%), pero no realizaron cultivo de los muestras (Slana *et al.*, 2011). El más actual de estos estudios fue realizado en Alemania donde se tomaron muestras de filtro de tanque de 55 tambos, logrando

identificar por cultivo en solo dos de ellos (El-Sayed *et al.*, 2013). Los resultados del presente ensayo concuerdan con los publicados en la bibliografía ya que se identificó MAP por cultivo en el 14,3% (1/7) de las muestras de filtro de leche obtenidos de diferentes establecimientos lecheros.

Estos datos evidencian que este dispositivo puede ser utilizado para detección de MAP a nivel rodeo ya que es una muestra a la cual se puede acceder fácilmente que siempre es descartada luego del ordeño y su procesamiento es más simple que el de las muestras de leche o materia fecal (Slana *et al.*, 2011).

El inconveniente que plantea la utilización del filtro de leche como herramienta de diagnóstico, es la posibilidad de aislamiento de otras micobacterias ambientales que puedan quedar retenidas, haciendo necesaria la diferenciación de las mismas. En el presente trabajo, en una de las muestras de filtro de leche se aisló *M. porcinum*, siendo el primer reporte de aislamiento de esta micobacteria a partir de muestras de leche bovina de tanque de enfriado en nuestro país.

Taddei *et al.* (2008) describieron el aislamiento de *M. porcinum* a partir del 8,2% de muestras de leche bovina de tanque recolectadas en el Norte de Italia. También fue aislado de aguas superficiales lo que indicaría que podría ser una de las fuentes de contaminación de la leche (Wallace *et al.*, 2004). *M. porcinum*, al ser una micobacteria de crecimiento rápido, podría interferir en el aislamiento de MAP a partir de muestras de leche suprimiendo su desarrollo ya que tiempo de generación de MAP es mucho mayor. Aunque los aislamientos analizados resultaron negativos a la PCR-IS900, se ha reportado que algunas cepas de *M. porcinum* poseen secuencias similares al IS900 con lo cual podría generar falsos positivos en el análisis por PCR para detección de MAP (Taddei *et al.*, 2008). Por otro lado, *M. porcinum* ha sido implicado en infecciones en humanos en distintos tipos de heridas y ha sido vinculado en casos de osteomielitis. En el presente trabajo solo se aisló *M. porcinum* a partir de una muestra lo cual no es significativo desde el punto de vista epidemiológico. Deberían evaluarse una mayor cantidad de muestras provenientes de distintos establecimientos lecheros para determinar la importancia de esta y otras micobacterias ambientales. Si bien en la leche cruda es muy común aislar distintas especies de micobacterias, algunas de ellas podrían ser patógenas constituyendo una fuente de infección para humanos (Kantor, 1976).

En base a lo expuesto, consideramos que la detección de estas micobacterias patógenas y potencialmente zoonóticas presentes en leche bovina, debería ser considerada toda vez que se analicen este tipo de muestras. Posteriormente se deberían evaluar las medidas necesarias para

evitar su transmisión dentro del establecimiento y las medidas de control e higiene correspondientes para evitar su presencia en leche destinada a consumo humano.

CONCLUSIONES

CAPÍTULO I

- El método de ácido oxálico fue el más adecuado para tratar muestras de leche cruda, a pesar de que disminuye la carga inicial de bacterias en aproximadamente 3 órdenes logarítmicos de UFC/mL.
- Para las muestras de leche pasteurizadas no sería necesario el proceso de descontaminación ya que la carga de bacterias contaminantes es muy baja o nula.
- Las metodologías de extracción de ADN IMB y kit comercial serían las más adecuadas para su utilización en muestras de leche.
- Es recomendable utilizar tanto el *pellet* como la fase grasa que se separa luego del centrifugado de muestras de leche para identificación de MAP a través de cultivo y PCR.
- Es recomendable mejorar el límite de detección de MAP tanto por cultivo como PCR para su identificación en muestras de leche.

CAPÍTULO II

- MAP resistiría las condiciones ácidas generadas durante la elaboración y las temperaturas de refrigeración del almacenamiento de yogur y quesos posibilitando su viabilidad hasta su comercialización.
- *E. coli* y *S. Enteritidis* resistirían los procesos de elaboración y almacenamiento del yogur cuando se encuentran en altas concentraciones en la leche cruda, previo a la elaboración.
- Es recomendable a aplicación de un tratamiento térmico a la leche cruda previo a la elaboración tanto de yogur como de quesos con el fin de obtener un alimento inocuo.

CAPÍTULO III

- Todos los cultivos fueron negativos en las muestras de leche, yogur y quesos comerciales lo cual podría indicar que no existieron micobacterias viables o que su concentración fue baja en el producto final seleccionado para este trabajo.
- La reacción de PCR para identificación de MAP fue positiva para el 1,56% de las muestras de leche comercial indicando podrían provenir de establecimientos lecheros con PTBC.
- Un 4,95% de las muestras de leche superan los límites que establece el CAA para recuentos de BAMT lo cual indicaría que la leche comercializada podría ser elaborada y conservada en forma incorrecta.
- Debería enfatizarse el control sanitario de PTBC en los rodeos lecheros así como en industrias lácteas, con el objetivo de proteger a los consumidores contra el posible riesgo de infección con MAP u otras bacterias potencialmente patógenas.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Aboagye, G. y Rowe, M. (2011). Occurrence of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in raw water and water treatment operations for the production of potable water. *Water Res.* **45**, 3271-3278.
2. Alisma, B., Yuksekdağ, Z., Sarıkayab, E., Beyatlı, Y. (2004). Determination of the bacteriocin-like substances produced by some lactic acid bacteria isolated from Turkish dairy products. *LWT- Food Sci Tech.* **38**, 691–694.
3. Alonso-Hearn, M., Molina, E., Geijo, M., Vazquez, P., Sevilla, I., Garrido, J., Juste, R. (2009). Isolation of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* from muscle tissue of naturally infected cattle. *Foodborne Pathog Dis.* **6**, 513–518.
4. Antognoli, M., Salman, M., Triantis, J., Hernandez, J., Keefe T. (2001). A one-tube nested polymerase chain reaction for the detection of *Mycobacterium bovis* in spiked milk samples: an evaluation of concentration and lytic techniques. *J Vet Diagn Invest.* **13**, 111–113.
5. Anzabi, Y. y Hanifian, S. (2012). Detection of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* in pasteurized milk by IS900 PCR and culture method. *Afr J of Microbiol Res.* **6**, 1453-1456.
6. Ayele, W., Svastova, P., Roubal, P., Bartos, M., Pavlik, I. (2005). *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* cultured from locally and commercially pasteurized cow's milk in the Czech Republic. *Appl Environ Microbiol.* **71**, 1210-1214.
7. Bachrouri, M., Quinto, E. and Mora, M. (2006). Kinetics parameters of *Escherichia coli* O157:H7 survival during fermentation of milk and refrigeration of home-made yoghurt. *Int Dairy J.* **16**, 474-481.
8. Badr, H. (2011). Inactivation of *Mycobacterium paratuberculosis* and *Mycobacterium tuberculosis* in fresh soft cheese by gamma radiation. *Radiat Phys Chem.* **80**, 1250-1257.
9. Bandzar, S., Gupta, S., Platt, M. (2013). Crohn's disease: A review of treatment options and current research. *Cellular Immunology.* **286**, 45–52.

10. Barrantes, X.; Railey, D.; Arias, M., Chaves, C. (2004). Evaluación del efecto de cultivos probióticos adicionados a yogurt comercial, sobre poblaciones conocidas de *Listeria monocytogenes* y *Escherichia coli* O157:H7. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*. <http://www.alanrevista.org/ediciones/2004-3>.
11. Becker, B., Pérez, A., Späth, E., Paolicchi, F., Morsella C. (2005). Distribución y factores de riesgo de Paratuberculosis bovina en la Pampa Húmeda Argentina. XII Simposio Internacional de la Asociación Mundial de Laboratorios de Diagnóstico Veterinario (WAVLD), Montevideo, Uruguay.
12. Behr, M. y Kapur, V. (2008). The evidence for *Mycobacterium paratuberculosis* in Crohn's disease. *Curr Opin Gastroen.* **24**, 17–21.
13. Botsaris, G., Slana, I., Liapi, M., Dodd, C., Economides, C., Rees, C., Pavlik, I. (2010). Rapid detection methods for viable *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* in milk and cheese. *Int J Food Microbiol.* **141**, S87–S90.
14. Bradner, S., Robbe-Austerman, S., Beitz, D., Stabel, J. (2013). Optimization of hexadecylpyridinium chloride decontamination for culture of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* from milk. *J Clin Microbiol.* **51**, 1575-1577.
15. Brennan, P., Nikaido, H. (1995). The envelop of mycobacteria. *Ann Rev Biochem.* **64**, 29–63.
16. Bull, T., Mc Minn, E., Sidi Boumedine, K., Skull, A., Durkin, D., Nheil, P., Rhodes, G., Pickup, R., Hermon-Taylor, J. (2003). Detection and verification of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in fresh ileocolonic mucosal biopsy specimens from individuals with and without Crohn's disease. *J Clin Microbiol.* **41**, 2915-2923.
17. Carvalho, A., Silva, A., Campos, V., Moreira, M. (2009). *Short communication*: Detection of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* by polymerase chain reaction in bovine milk in Brazil. *J of Dairy Sci.* **92**, 5408-5410.
18. Carvalho, I., Pietralonga, P., Schwarz, D., Faria, C., Moreira, M. (2012). *Short communication*: Recovery of viable *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* from retail pasteurized whole milk in Brazil. *J Dairy Sci.* **95**, 6946-6948.

19. Cetinkaya, B., Egan, K., Harbour, D., Morgan, K. (1996). An abattoir-based study of the prevalence of subclinical Johne's disease in adult cattle in south west England. *Epidemiol Infect.* **116**, 373–379.
20. Cashman, W., Buckley, J., Quigley, T., Fanning, S., More, S., Egan, J., Berry, D., Grant, I., O'Farrell, K. (2008). Risk factors for the introduction and within-herd transmission of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* (MAP) infection on 59 Irish dairy herds. *Ir Vet J.* **61**, 464–467.
21. Chiodini, R. y Hermon-Taylor, J. (1993). The thermal resistance of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in raw milk under conditions simulating pasteurization. *J Vet Diag Invest.* **5**, 629-631.
22. Cirone, K., Morsella, C., Romano, M., Paolicchi, F. (2005) XII Simposio Internacional de la Asociación Mundial de Laboratorios de Diagnóstico Veterinario (WAVLD), Montevideo, Uruguay.
23. Cirone, K., Morsella, C., Colombo, D., Paolicchi, F. (2006). Viabilidad de *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* en la maduración de quesos caprinos y bovinos. *Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana.* **40**, 507-513.
24. Clark, D., Anderson, J., Koziczowski, J., Ellingson J. (2006). Detection of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* genetic components in retail cheese curds purchased in Wisconsin and Minnesota by PCR. *Molecular and Cellular Probes.* **20**, 197–202.
25. Código Alimentario Argentino. (1992). (R 494, 1/7/94).
26. Collins, M. y Morgan, I. (1991). Epidemiological model of Paratuberculosis in dairy cattle. *Prev Vet Med.* **11**, 131-146.
27. Collins, D., Stephens, D., Lisle, G. (1993). Comparison of polymerase chain reaction test and fecal culture for detecting *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in bovine faeces. *Vet Microbiol.* **36**, 289-299.
28. Collins, M., Goodger, W., Nordlund, K., Pelletier, J. (1996). Associations between subclinical paratuberculosis and milk production, milk components, and somatic cell counts in dairy herds. *J Am Vet Med Assoc.* **208**, 1872-1876.

29. Collins, M. y Sung N. (2000). Effect of three factors in cheese production (pH, salt and heat) on *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* viability. *Appl Environ Microbiol.* **66**, 1334-1339.
30. Cruickshank, R., Marmion, B., Swain, R. (1975). *Medical Microbiology*. Volumen two: Churchill Livingstone, Edinburgh, London and New York.
31. de Juan Ferré, L. (2005). *Paratuberculosis Caprina. Aportaciones a su Diagnóstico, Epidemiología Molecular y Control*. Tesis doctoral. Facultad de Veterinaria, Universidad Complutense de Madrid. Madrid, España. 299 p.
32. Dimareli-Malli, Z., Mazaraki, K., Stevenson, K., Tsakos, P., Zdragas, A, Giantzi, V., Petridou, E., Heron, I., Vafeas, G. (2013). Culture phenotypes and molecular characterization of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* isolates from small ruminants. *Res Vet Sci.* **95**, 49-53.
33. Dineen S., Takeuchi, K., Soudah J., Boor K. (1998). Persistence of *Escherichia coli* O157:H7 in dairy fermentation systems. *J Food Prot.* **61**, 1602–1608.
34. Donaghy, J., Totton, N., Rowe, M. (2003). Evaluation of culture media for the recovery of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* from Cheddar cheese. *Lett Appl Microbiol.* **37**, 285-201.
35. Donaghy, J., Totton, N., Rowe M. (2004). Persistence of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* during manufacture and ripening of Cheedar cheese. *Appl Environ Microbiol.* **70**, 4899-4905.
36. Dundee, L., Grant, I., Ball, H., Rowe, M. (2001). Comparative evaluation of four decontamination protocols for the isolation of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* from milk. *Lett Appl Microbiol.* **33**, 173-177.
37. Dunkin, G. y Balfour-Jones, S. (1935). Preliminary investigation of a disease of sheep possessing certain characteristics simulating Johne's disease. *J Comp Pathol.* **48**, 236–240.
38. El-Sayed, A., Natour, S., Abdou, M., Salem, M., Hassan, A., Wolter, W., Zschöck, M. (2013). Detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in manure and milk filters of apparently healthy dairy herds in Hesse, Germany. *J Am Sci.* **9**, 469-474.

39. Ellingson, J., Anderson, J., Koziczowski, J., Radcliff, R., Sloan, S., Allen, S., Sullivan, N. (2005). Detection of viable *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in retail pasteurized whole milk by two culture methods and PCR. *J Food Prot.* **68**, 966-972.
40. Eltholth, M., Marsh, V., Van Winden, S., Guitian, F. (2009). Contamination of food products with *Mycobacterium avium paratuberculosis*: a systematic review. *J Appl Microbiol.* **107**, 1061–1071.
41. Falkinham, J. (2010). Impact of human activities on the ecology of nontuberculosis mycobacteria. *Future Microbiol.* **5**, 951-960.
42. Farias, A., Schwarz, D., Carvalho, I., Rocha, B., De Carvalho Castro, K., Silva, M., Moreira, M. (2014). Short communication: Viable *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* in retail artisanal Coalho cheese from Northeastern Brazil. *J Dairy Sci.* **97**, 1-4.
43. Faye, B. y Konuspayeva, G. (2012). The sustainability challenge to the dairy sector– The growing importance of non-cattle milk production worldwide. *Int Dairy J.* **24**, 50-56.
44. FIL-IDF 100B-1991. (1991). Milk and milk products. Enumeration of microorganisms. Colony count technique at 30°C. IDF Square Verote 41, B-100 Brussels, Belgium.
45. Fiorentino, A., Gioffré, A., Cirone, K., Morsella C., Alonso, B., Delgado, F., Paolicchi, F. (2012). First isolation of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in a dairy goat in Argentina: Pathology and molecular characterization. *Small Ruminant Res.* **108**, 133-136.
46. Freitas, R., Nero, L., Carvalho, A. (2009). *Technical note*: Enumeration of mesophilic aerobes in milk: Evaluation of standard official protocols and Petrifilm aerobic count plates. *J Dairy Sci.* **92**, 3069-3073.
47. Gao, A., Mutharia, L., Chen, S., Rahn, K., Odumeru, J. (2002). Effect of pasteurization on survival of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in milk. *J Dairy Sci.* **85**, 3198-3205.
48. Gao, A., Odumeru, J., Raymond, M., Mutharia, L. (2005). Development of improved method for isolation of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* from bulk tank milk: Effect of age of milk, centrifugation, and decontamination. *Can J Vet Res.* **69**, 81-87.

49. Gao, A., Mutharia, L., Raymond, M., Odumeru, J. (2007). Improved template DNA preparation procedure for detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in milk by PCR. *J Microbiol Methods*. **69**, 417–420.
50. Gao, A., Odumeru, J., Raymond, M., Hendrick, S., Duffield, T., Mutharia L. (2009). Comparison of milk culture, direct and nested polymerase chain reaction (PCR) with fecal culture based on samples from dairy herds infected with *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. *Can J Vet Res*. **73**, 58–64.
51. Garabetyan E. “Asuntos Internos”. En: Página 12; 16 de Abril 2005 (Pagina Web: www.pagina12.com.ar 13/09/2005).
52. Giese, S. y Ahrens, P. (1999). Detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in milk from clinically affected cows by PCR and culture. En Proc 6th Int Colloq on Paratuberculosis. P. 553-558. International Association of Paratuberculosis inc., Madison, WI.
53. Giese, S. y Ahrens P. (2000). Detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in milk from clinically affected cows by PCR and culture. *Vet Microbiol*. **77**, 291-297.
54. Gilardoni, L. (2012). Estrategia diagnóstica de paratuberculosis en bovinos. Tesis doctoral 2012, Universidad Nacional de Buenos Aires, Facultad de Ciencias Veterinarias, Buenos Aires, Argentina.
55. Glawischnig, W., Steineck, T., Spargser, J. (2006). Infections caused by *Mycobacterium avium* subspecies *avium*, *hominissuis*, and *paratuberculosis* in free-ranging red deer (*Cervus elaphus hippelaphus*) in Austria, 2001-2004. *J Wildl Dis*. **42**, 724-731.
56. Gonzalez-Merchand, J., Garcia, M., Gonzalez-Rico, S., Colston, M., Cox, R. (1997). Strategies used by pathogenic and non pathogenic mycobacteria to synthesize rRNA. *J Bacteriol*. **179**, 6949–6958.
57. Gould, G., Franken, P., Hammer, P., Mackey, B., Shanahan, F. *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in the food chain; International Life Science Institute (ILSI) Report 2004; 36 pág.
58. Govaris, A., Koidis, P., Papatheodorou, K. (2002). Behaviour of *Escherichia coli* O157:H7 in sour milk, cows’ milk yogurt and ewes’ milk yogurt. *J of Dairy Res*. **69**, 655–660.

59. Grant, I., Ball, H., Neill, S., Rowe, M. (1996). Inactivation of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in cows' milk at pasteurization temperatures. *Appl Environ Microbiol.* **62**, 631-636.
60. Grant, I., Ball, H., Rowe, M. (1998). Isolation of *Mycobacterium paratuberculosis* from milk by immunomagnetic separation. *Appl Environ Microbiol.* **64**, 3153-3158.
61. Grant, I., Ball, H., Rowe, M. (1999). Effect of higher pasteurization temperatures, and longer holding times at 72°C, on the inactivation of *Mycobacterium paratuberculosis* in milk. *Lett Appl Microbiol.* **28**, 461-465.
62. Grant, I., Pope, C., O'Riordan, L., Ball, H., Rowe, M. (2000). Improved detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in milk by immunomagnetic PCR. *Vet Microbiol.* **77**, 369-378.
63. Grant, I., Hitchings, E., McCartney, A., Ferguson, F., Rowe, M. (2002a). Effect of commercial-scale high-temperature, short-time pasteurization on the viability of *Mycobacterium paratuberculosis* in naturally infected cows' milk. *Appl Environ Microbiol.* **68**, 602-607.
64. Grant, I., Ball, H., Rowe, M. (2002b). Incidence of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in bulk raw and commercial pasteurized cow's milk from approved dairy processing establishments in the United Kingdom. *Appl Environ Microbiol.* **68**, 428-2435.
65. Grant, I., Ball, H., Rowe, M. (2002c). Effectiveness of milk pasteurization in relation of *Mycobacterium paratuberculosis*. *Res Vet Sci.* **72**, 29.
66. Grant, I., Kirk, R., Hitchings, E., Rowe, M. (2003). Comparative evaluation of the MGIT and BACTEC culture systems for the recovery of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* from milk. *J Appl Microbiol.* **95**, 196-201.
67. Grant I. y Rowe M. (2004). Effect of chemical decontamination and refrigerated storage on the isolation of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* from heat-treated milk. *Lett Appl Microbiol.* **38**, 283-288.
68. Grant I. (2005). Zoonotic potential of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*: the current position. *J Appl Microbiol.* **98**, 1282-1293.

69. Grant I., Williams A., Rowe M., Muir D. (2005). Efficacy of various pasteurization time-temperature conditions in combination with homogenization on inactivation of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in milk. *Appl Environ Microbiol.* **71**, 2853–2861.
70. Grant I. (2006). *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in foods: current evidence and potential consequences. *Inter J of Dairy Tech.* **59**, 112-117.
71. Green, G., Tizard, M., Thompson, J., Winterbourne, D., Mc Fadden, J., Hermon-Taylor, J. (1989). Sequence and characteristic of IS900, and insertion sequence identified in human Crohn's disease isolate of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. *Nucleic acid Research.* **17**, 9063-9073.
72. Greenstein R. (2003). Is Crohn's disease caused by a mycobacterium? Comparasions with leprosy, tuberculosis, and Johne's disease. *The Lancet infectious disease.* **3**, 507-513.
73. Hall-Stoodley, L., Keevil, C., Lappin-Scott, H. (1999). *Mycobacterium fortuitum* and *Mycobacterium chelonae* biofilm formation under high and low nutrients conditions. *J Appl Microbiol.* **85**, 60-69.
74. Hammer, P., Kiesner, C., Walte, H., Knappstein, K., Teufel, P. (2002). Heat resistance of *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* in raw milk tested in a pilot plant pasteurizer. *Kieler Milchwirtschaftliche Forschungsberichte.* **54**, 275–230.
75. Hammer, P., Kiesner, C., Walte, H. (2014). Effect of homogenization on heat inactivation of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* in milk. *J of Dairy Sci.* **97**, 2045-2048.
76. Hermon-Taylor, J., Barnes, N., Clarke, C., Finlayson, C. (1998). Grand round — *Mycobacterium paratuberculosis* cervical lymphadenitis, followed five years later by terminal ileitis similar to Crohn's disease. *Brit Med J.* **316**, 449–453.
77. Hermon-Taylor. (2001). *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*: the nature of the problem. *Food Control.* **12**, 331-334.
78. Hermon-Taylor, J. y Bull, T. (2002). Crohn's disease causes by *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*: a public health tragedy whose resolution is long overdue. *J Med Microbiol.* **51**, 3-6.

79. Herrold, R. (1931). Egg yolk agar medium for the growth of tubercle bacilli. *J Infec Dis.* **48**, 236–241.
80. Hill, B., Smythe, B., Lindsay, D., Shepered, J. (2012). Microbiology of raw milk in New Zealand. *Int J of Food Microbiol.* **157**, 305-308.
81. Hosek, J., Svastova, P., Moravkova, M., Pavlik, I., Bartos, M. (2006). Methods of mycobacterial DNA isolation from different biological material: a review. *Vet Med-Czech.* **51**, 180-192.
82. Hruska, K., Bartos, M., Kralik, P. and Pavlik, I. (2005). *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in powdered infant milk: paratuberculosis in cattle- the public health problem to be solved. *Vet Med-Czech.* **50**, 327-335.
83. Ikonomopoulos, J., Pavlik, I., Bartos, M., Svastova, P., Ayele, W., Roubal, P. (2005). Detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in retail cheeses from Greece and Czech Republic. *Appl Environ Microbiol.* **71**, 8934-8936.
84. Jakobsen, M., Alban, L., Nielsen, S. (2000). A cross-sectional study of paratuberculosis in 1155 Danish dairy cows. *Prev Vet Med.* **46**, 15–27.
85. Jayarao, B., Pillai, S., Wolfgang, D., Griswold, D., Rossiter, C., Tewari, D., Burns, C., Hutchinson, L. (2004). Evaluation of IS900-PCR assay for detection of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* infection in cattle using quarter milk and bulk tank milk samples. *Foodborne Pathog Dis.* **1**, 17-26.
86. Jones, D. y Kay, J. (1996). Serum biochemistry and the diagnosis of Johne's disease (paratuberculosis) in sheep. *Vet Rec.* **139**, 498-499.
87. Judge, J., Kyriazakis, I., Greig, A., Allcroft, D., Hutchings, M. (2005). Clustering of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in rabbits and the environment: how hot is a hot spot? *Appl Environ Microbiol.* **71**, 6033-6038.
88. Juste, R., Marco, J., Sáez de Ocariz, C., Adúriz, J. (1991). Comparison of different media for the isolation of small ruminant strains of *Mycobacterium paratuberculosis*. *Vet Microbiol.* **28**, 385-390.

89. Kalis, C., Hesselink, J., Barkema, H., Collins, M. (2000). Culture of strategically pooled bovine fecal samples as a method to screen herds for paratuberculosis. *J Vet Diag Invest.* **12**, 547–551.
90. Kantor, I. (1976). Micobacterias aisladas de muestras de leche en Buenos Aires, Argentina. *Rev Arg Tuberc y Enf Pulm.* **37**, 1-4.
91. Kazda, J., Pavlik, I., Falkinham, J., Hruska, K. (2009). The Ecology of Mycobacteria: Impact on Animal's and Human's Health. Springer, 1st ed. XVIII 522p.
92. Kennedy, D. y Benedictus, G. (2001). Control de *Mycobacterium avium* subsp *paratuberculosis* infección in agricultural species. En: Infecciones micobacterianas en animales domésticos y salvajes. Ed. Manning, EJB y Collins T. Rev. Sci. tech Off. Int. Epiz.,20 (1):151-170.
93. Keswani, J. y Frank, J. (1998). Thermal inactivation of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in milk. *J Food Prot.* **61**, 974–978.
94. Khare, S., Ficht, T., Santos, R. (2004). Rapid and sensitive detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in bovine milk and feces by a combination of immunomagnetic bead separation-conventional PCR and real-time PCR. *J Clin Microbiol.* **42**, 1075–1081.
95. Klanicova, B., Slana, I., Roubal, P., Pavlik, I., Kralik, P. (2012). *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* survival during fermentation of soured milk products detected by culture and quantitative real time PCR methods. *Int J Food Microbiol.* **157**, 150-155.
96. Klijn, N., Herrewegh, A., de Jong, P. (2001). Heat inactivation data for *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*: implications for interpretation. *J Appl Bacteriol.* **91**, 697-704.
97. Lagadic, P., Le Menec, M., Argente, G., Lecoz, N., Massard, M., Moisan, J., Quiniou, M. (1983). Techniques de cultures de *Mycobacterium paratuberculosis*: leur utilisation en routine dans un laboratoire de diagnostic. *Recl Med Vet.* **159**, 801-807.
98. Lambrecht, R. y Collins, M. (1992). *Mycobacterium paratuberculosis*: Factors that influence mycobactin dependence. *Diagn Microbiol Infect Dis.***15**, 239-246.
99. Lapidus A. (2006). Crohn's disease in Stockholm County during 1990-2001: An epidemiological update. *World J Gastroenterol.* **12**, 75-81.

100. Le Dantec, C., Duguet, J., Montiel, A., Dumoutier, N., Dubrou, S., Vincent, V. (2002). Occurrence of mycobacteria in water treatment lines and in water distribution systems. *Appl Environ Microbiol.* **68**, 5318-5325.
101. Lehtola, M., Torvinen, E., Miettinen, L., Keevil, C. (2006). Fluorescence in situ hybridization using peptide nucleic acid probes for rapid detection of *Mycobacterium avium* subsp *avium* and *Mycobacterium avium* subsp *paratuberculosis* in potable-water biofilms. *Appl Environ Microbiol.* **72**, 848-853.
102. Li, L., Bannantine, J., Zhang, Q., Amonsin, A., May, B., Alt, D., Banerji, N. Kanjilal, S., Kapur, V. (2005). The complete genome sequence of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis*. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* **102**, 12344-12349.
103. López-Pedemonte, T., Sevilla, I., Garrindo, J., Aduriz, G., Guamins, B., Juste, R., Roig-Sagues, A. (2006). Inactivation of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in cows milk by means of high hydrostatic pressure at mild temperatures. *Appl Environ Microbiol.* **72**, 4446-4449.
104. Lund, B., Gould, G., Rampling, A. (2002). Pasteurization of milk and heat resistance of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*: a critical review of the data. *J Food Microbiol.* **77**, 135-145.
105. Lynch, D., Jordan, K., Kelly, P., Freyne, T., Murphy, M. (2007). Heat sensitivity of *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* in milk under pilot plant pasteurization conditions. *Int J Dairy Tech*, **60**, 98-104.
106. Maisnier-Patin, S., Deschamps, N., Tatini, S., Richard, J. (1992). Inhibition of *Listeria monocytogenes* in camembert cheese made with a nisin-producing starter. *Le Lait.* **72**, 249–263.
107. Manning, E. y Collins, M. (2001). *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*: pathogens, pathogenesis and diagnosis. *Rev Sci Tech Int Epiz.* **20**, 133-150.
108. Manning, E. y Collins, M. (2010). Epidemiology of Paratuberculosis. En: Behr, M., Collins, D. (Eds.), *Paratuberculosis: Organism, Disease, Control*. CABI, Cambridge, MA, USA, pp. 22–28.
109. Massa, S., Altieri, C., Quaranta, V., de Pace, R. (1997). Survival of *Escherichia coli* O157:H7 in yoghurt during preparation and storage at 4°C. *Lett Appl Microbiol.* **24**, 347–350.

110. Mc Donald, W., O'Riley, K., Schroen, J., Condon, R. (2005). Heat inactivation of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in milk. *Appl Environ Microbiol.* **71**, 1785-1789.
111. McGee, J. y Ward, A. (2012). Genus *Mycobacterium*. In: Goodfellow, M., Kämpfer, P., Busse, H-J., *et al.*, editors. *Bergey's Manual for Systematic Bacteriology*, 2nd ed., Vol 5. Athens, GA: Williams & Wilkins; p. 312-75.
112. McKee, R., Grant, I., Rowe, M., Buckley, H., Buckley, J., Fanning, S. (2002). Examination of in-line filters to detect *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* infection at farm level. P 258–260. *En Proc 7th Int Colloq Paratuberculosis*. International Association for Paratuberculosis Inc., Madison, WI.
113. Merkal, R., Kopecky, K., Larsen, A., Thurston, J. (1964). Improvements in the techniques for primary cultivation of *Mycobacterium paratuberculosis*. *Am J Vet Res.* **25**, 1290-1293.
114. Merkal, R. t Richards, W. (1973). Inhibition of fungal growth in the cultural isolation of *Mycobacteria*. *Appl Microbiol*; **24**, 205-207.
115. Merkal, R. (1984). Paratuberculosis: advances in cultural, serologic, and vaccination methods. *J Am Vet Med Assoc.* **184**, 939-943.
116. Millar, D., Ford, J., Sanderson, J., Withey, S., Tizard, M., Doran, T., Hermon-Taylor, J. (1996). IS900 PCR to detect *Mycobacterium paratuberculosis* in retail supplies of whole pasteurized cows' milk in England and Wales. *Appl and Environ Microbiol.* **62**, 3446–3452.
117. Ministerio de Agricultura, Ganadería y Pesca –B.A.– Argentina, 2012. (http://64.76.123.202/site/_subsecretaria_de_lecheria/lecheria/07_Estad%C3%ADsticas/index.php).
118. Moravkova, M., Trcka, I., Lamka, J., Pavlik I. (2008). A mixed infection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* and *M. a. hominissuis* in one red deer (*Cervus elaphus*) studied by IS900 BstEII and IS1245 PvuII RFLP analyses: a case report. *Veterinarni Medicina.* **53**, 445-451.
119. Moreira, A., Paolicchi, F., Morsella, C., Zumárraga, M., Cataldi, A., Bigi, F., Alito, A., van Soolingen, D., Romano, M. (1999). Distribution of IS900 restriction length polymorphism types

- among animal *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* isolates from Argentina and Europe. *J Vet Microbiol.* **70**, 251-259.
120. Morton, D. (2001). Aerobic Plate Count. In: Downes, F. P., Ito, K. eds. Compendium of Methods for Microbiological Examination of Foods. American Public Health Association, Washington, USA. Pp 63-68.
121. Motiwala, A., Strother, M., Theus, N., Stich, R., Byrum, B., Shulaw, W., Kapur, V., Sreevatsan, S. (2005). Rapid detection and typing of strains of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* from broth cultures. *J Clinical Microbiol.* **43**, 2111-2117.
122. Naser, S., Schwartz, D., Shafran, I. (2000). Isolation of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* from breast milk of Crohn's disease patients. *Am J Gastroenterol.* **95**, 1094-1095.
123. Nemeth, A., Gasparik-Reichardt, J., Farkas, J., Balogh, I., Andrassy, E. (1996). Identification and characterization of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. *Fleischwirtschaft.* **76**, 911-916.
124. Nettles, C. y Barefoot, S. (1993). Biochemical and genetic characteristics of bacteriocins of food associated lactic acid bacteria. *J Food Protect.* **56**, 338-356.
125. Odumeru, J., Gao, A., Chen, S., Raymond, M., Mutharia, L. (2001). Use of the bead beater for preparation of *Mycobacterium paratuberculosis* template DNA in milk. *Can J Vet Res.* **65**, 201-205.
126. OIE (2010). Código Sanitario para los Animales Terrestres. Cap. 8 y 9.
127. OIE, O. I. d. E. (2011). Paratuberculosis (Johnes's disease) In: Manual of Diagnostic Test and Vaccines for Terrestrial Animals 2011.
128. O'Doherty, A., O'Grady, D., Smith, T., Egan, J. (2002). *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in pasteurised and unpasteurised milk in the Republic of Ireland. *Ir J Agr Food Res.* **41**, 117-121.
129. O'Mahony, J., Hill, C. (2004). Rapid real-time PCR assay for detection and quantitation of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* DNA in artificially contaminated milk. *Appl Environ Microbiol.* **70**, 4561-4568.

130. O'Reilly, C., O'Connor, L., Anderson, W., Harvey, P., Grant, I., Donaghy, J., Rowe, M., O'Mahony, P. (2004). Surveillance of bulk raw and commercially pasteurized cow's milk from approved Irish liquid-milk pasteurization plants to determine the incidence of *Mycobacterium paratuberculosis*. *Appl Environ Microbiol.* **70**, 5138-5144.
131. Ott, S., Wells, S., Wagner, B. (1999). Herd-level economic losses associated with Johne's disease on US dairy operations. *Prev Vet Med.* **40**, 179-192.
132. Paolicchi, F., Zumárraga, M., Giofré, A., Zamorano, P., Morsella, C., Verna, A., Cataldi, A., Alito, A., Romano, M. (2003). Application of different methods for the diagnosis of paratuberculosis in dairy cattle herds in Argentina. *J Vet Med.* **50**, 20-26.
133. Paolicchi, F., Cirone, K., Morsella, C., Giofré, A. (2012). First isolation of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* from commercial pasteurized milk in Argentina. *Braz J Microbiol.* **2012**, 1034-1037.
134. Patel, A. y Shah, N. (2011). *Mycobacterium avium* subsp *paratuberculosis* - incidences in milk and milk products, their isolation, enumeration, characterization, and role in human health. *J Microbiol Immunol Infect.* **44**, 473-479.
135. Pavlik, I., Matlova, L., Bartl, J., Svastova, P., Dvorska, L., Whitlock, R. (2000). Parallel faecal and organ *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* culture of different productivity types of cattle. *Vet Microbiol.* **77**, 309-324.
136. Pavlik, I., Falkinham, J., Kazda, J. (2009). Transmission of mycobacteria from the environment to susceptible hosts. In: Kazda, J., Pavlik, I., Falkinham, J., Hruska, K. (Eds.), *The Ecology of Mycobacteria: Impact on Animal's and Human's Health*. Springer, pp. 135-140.
137. Pearce, L., Truong, T., Crawford, R., Yates, G., Cavaignac, S., Lisle G. (2001). Effect of turbulent-flow pasteurisation on survival of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* added to raw milk. *Appl Environ Microbiol.* **67**, 3964-3969
138. Pickup, R., Rhodes, G., Arnott, S., Sidi-Boumedine, K., Bull, T., Weighman, A., Hurley, M., Hermon Taylor, J. (2005). *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in the catchment area and water of the river Taff in South Wales, UK and its potential relationship to clustering of Crohn's disease cases in the city of Cardiff. *Appl Environ Microbiol.* **71**, 2130-2139.

139. Pinedo, P., Williams, J., Monif, G., Rae, D., Buergelt, C. (2008). *Mycobacterium paratuberculosis* shedding into milk: association of ELISA seroreactivity with DNA detection in milk. *Inter J Appl Res Vet Med.* **6**, 137-144.
140. Pinzon Fernandez, A. (2006). Determinación del índice de bacterias mesófilas aerobias versus leche pasteurizada que se comercializan en la zona urbana de la ciudad de Popayan. Tesis Doctoral 2006, Universidad Nacional Abierta y a Distancia, Facultad de Ciencias Agrarias, Popayán, Colombia.
141. Ponnusamy, D., Periasamy, S., Tripathi, B., Pal, A. (2013). *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* invades through M cells and enterocytes across ileal and jejunal mucosa of lambs. *Res Vet Sci.* **94**, 306–312.
142. Poupart, P., Coene, M., Van Heuverswyn, H., Cocito, C. (1993). Preparation of a specific RNA probe for detection of *Mycobacterium paratuberculosis* and diagnosis of Johne's disease. *J Clin Microbiol.* **31**, 1601–1605.
143. Pyrgiotakis, G., McDevitt, J., Gao, Y., Branco, A., Eleftheriadou, M., Lemos, B., Nardell, E., Demokritou, P. (2014). Mycobacteria inactivation using Engineered Water Nanostructures (EWNS). *Nanomed-Nanotechnol.* Artículo en prensa.
144. Rademaker, J., Meeuwisse, J., Giffel, M. (2002). Heat inactivation of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. Proceedings of the 7th International Colloquium on Paratuberculosis. p. 317-319, Bilbao, Spain.
145. Rademaker, J., Vissers, M., te Giffel, M. (2007). Effective heat inactivation of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in raw milk contaminated with naturally infected feces. *Appl Environ Microbiol.* **73**, 4185-4190.
146. Rampling, A., Greenwood, M., Davies, G. (2004). Use of a fluorimetric test for bovine alkaline phosphatase to demonstrate under-pasteurisation of skimmed milk and cream. *Int Dairy J.* **14**, 691-695.
147. Rankin, S., Christiansen, A., Lee, W., Banavara, D., López-Hernández, A. (2010). Invited review: The application of alkaline phosphatase assays for the validation of milk product pasteurization. *J Dairy Sci.* **93**, 5538-5551.

- 148.Reddacliff, L., Vadali, A., Whittington, RJ. (2003). The effect of decontamination protocols on the numbers of sheep strain *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* isolated from tissues and faeces. *Vet Microbiol.* **95**, 271-282.
- 149.Richter, E., Wessling, J., Lugering, N., Domschke, W., Gerdes-Rush S. (2002). *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* infection in a patient with HIV, Germany. *Emerging Infectious disease.* **8**, 729-730.
150. Rosenfeld, G., Bressler, B. (2010). *Mycobacterium avium paratuberculosis* and the etiology of Crohn's disease: a review of the controversy from the clinician's perspective. *Can J Gastroenterol.* **24**, 619-624.
- 151.Rowan, N., MacGregor, S, Anderson, J., Cameron, D., Farish O. (2005). Inactivation of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* by pulsed electric fields. *Appl Environ Microbiol.* **67**, 2833-2836.
- 152.Sanderson, J., Moss, M., Tizard, M., Hermon-Taylor, J. (1992). *Mycobacterium paratuberculosis* DNA in Crohns-disease tissue. *Gut.* **33**, 890-896.
- 153.SAS Inst. Inc., C., NC (1998). Statistical Analysis System. SAS User's Guide: Statistics.
- 154.Saxegaarf, F. (1985). Isolation of *Mycobacterium paratuberculosis* from intestinal mucosa and mesenteric lymph nodes of goats by use of selective Dubos medium. *J Clin Microbiol.* **22**, 312-313.
- 155.Schaller A. Informe Sagpya Mayo 2006. Análisis de cadena: Lácteos http://www.alimentosargentinos.gov.ar/03/revistas/r_32/cadenas/Lacteos_Ptos_Lacteos.htm.
- 156.Sechi, L., Manuela, M., Francesco, T., Amélia, L., Antonello, S., Giovanni, F. (2001). Identification of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in biopsy specimens from patients with Crohn's disease identified by in situ hibridation. *J Clin Microbiol.* **39**, 4514-4517.
- 157.Serraino, A., Bonilauri, P., Arrigoni, N., Ostanello, F., Ricchi, M., Marchetti, G., Bonfante, E., Albonetti, S., Giacometti, F. (2014). Quantitative risk assessment of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* survival in pasteurized milk in three dairy plants in Italy. *Food Control.* **45**, 120-126.

158. Shankar, H., Singh, S., Singh, P., Singh A., Sohal J., Greenstein, R. (2010). Presence, characterization, and genotype profiles of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* from unpasteurized individual and pooled milk, commercial pasteurized milk, and milk products in India by culture, PCR and PCR- REA methods. *Int J Infect Dis.* **14**, 121-126.
159. Slana, I., F. Paolicchi, B. Janstova, P. Navratilova, and I. Pavlik. (2008). Detection methods for *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in milk and milk products: a review. *Vet Medicina.* **53**, 286-306.
160. Slana, I., Kralik, P., Kralova, A., Babak, V., Pavlik, I. (2011). Short communication: Examination of milk filters by real-time PCR as a herd-level indicator of the presence of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* in dairy herds. *J Dairy Sci.* **95**, 1162–1165.
161. Snow G. (1970). Mycobactins: iron-chelating growth factor from Mycobacteria. *Bacteriol Rev.* **34**, 99-125.
162. Soudah, J., Boor, K., Jeffers, G. (1996). The persistence of *Escherichia coli* O157:H7 in dairy products fermented by lactic acid bacteria. *J of Dairy Sci.* **79**, 121–126.
163. Spahr, U. y Schafroth, K. (2001). Fate of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in Swiss Hard and Semihard cheese manufactured from raw milk. *Appl Environ Microbiol.* **64**, 4199-4205.
164. Stabel, J., Steadham, E., Bolin, C. (1997). Heat inactivation of *Mycobacterium paratuberculosis* in raw milk: are current pasteurization conditions effective? *Appl Environ Microbiol.* **63**, 4975–4977.
165. Stabel J. (2001). On-farm batch pasteurization destroys *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in waste milk. *J Dairy Sci.* **84**, 524-527.
166. Stabel, J., Wells, S., Wagner, B. (2002). Relationships between fecal culture, ELISA and bulk tank milk results for Johne’s disease in US dairy herds. *J Dairy Sci.* **85**, 525-531.
167. Stabel, J. y Lambertz A. (2004). Efficacy of pasteurization conditions for the inactivation of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in milk. *J Food Protect.* **67**, 2719-2726.

168. Stephan, R., Schumacher, R., Tasara, T., Grant, I. (2007). Prevalence of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in Swiss raw milk cheeses collected at the retail level. *J Dairy Sci.* **90**, 3390-3595.
169. Streeter, R., Hoffsis, G., Bech-Nielsen, S., Shulaw, W., Rings, D. (1995). Isolation of *Mycobacterium paratuberculosis* from colostrum and milk of subclinically infected cows. *Am J Vet Res.* **56**, 1322–1324.
170. Sung, N. y Collins, M. (1998). Thermal tolerance of *Mycobacterium paratuberculosis*. *Appl Environ Microbiol.* **64**, 999–005.
171. Sung, N. y Collins, M. (2003). Variation in resistance of *Mycobacterium paratuberculosis* to acid environments as a function of culture medium. *Appl Environ Microbiol.* **69**, 6833-6840.
172. Sweeney, R., Whitlock, R., Rosenberger, A. (1992). *Mycobacterium paratuberculosis* cultured from milk and supramammary lymph nodes of infected asymptomatic cows. *J Clin Microbiol.* **30**, 166–171.
173. Tacquet, A., Tison, F., Devulder, B., Roos, P. (1967). Techniques for decontamination of pathological specimens for culturing mycobacteria. *Bull Int Union Tuberc.* **39**, 21-24.
174. Taddei, R., Barbieri, I., Pacciarini, M., Fallacara, F., Belletti, G., Arrigoni, N. (2008). *Mycobacterium porcinum* strains isolated from bovine bulk milk: implications for *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* detection by PCR and culture. *Vet Microbiol.* **130**, 338-347.
175. Telenti, A., Marchesi, F., Balz, M., Bally, F., Bottger, E., Bodmer, T. (1993). Rapid identification of mycobacteriata to the species level by polymerase chain reaction and restriction enzyme analysis. *J Clin Microbiol.* **31**, 175-178.
176. Thorel, M., Krichevsky, M., Levy-Frebault, V. (1990). Numerical taxonomy of mycobactin-dependent micobacteria, emended description of *Mycobacterium avium* subsp. *avium* subsp. nov., *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* subsp. nov., *Mycobacterium avium* subsp. *silvaticum* subsp. nov. *Int J Sist Bact.* **40**, 254-260.
177. Thomas, G. (1983). Paratuberculosis in a large goat herd. *Vet Rec.* **113**, 464-466.

178. Tosun, H. y Aktug Gonul, S. (2005). The effect of acid adaptation conditions on acid tolerance response of *Escherichia coli* O157:H7. *Turkish Journal of Biology*. **29**, 197–102.
179. Uraz, G., Simsek, H., Maras, Y. (2001). The inhibitory effects of *Lactobacillus casei* and *Lactobacillus helveticus* on *Bacillus* species isolated from raw milk in various salt concentrations. *Soc Dairy Tech*. **54**, 146–150.
180. Uzoigwe, J., Khaitza, M., Gibbs, P. (2007). Epidemiological evidence for *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* as a cause of Crohn's disease. *Epidemiol Infect*. **135**, 1057–1068.
181. van Brandt, L.; Coudijzer, K.; Herman, L.; Michiels, C.; Hendrickx, M.; Vlaemynck, G. (2011a). Survival of *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* in yoghurt and in commercial fermented milk products containing probiotic cultures. *J of Appl Microbiol*. **110**, 1252–1261 - 2011.
182. van Brandt, L., van der Planchen, I., de Block, J., Vlaemynck, G., van Coillie, E., Herman, L., Hendrickx, M. (2011b). Adequacy of current pasteurization standards to inactivate *Mycobacterium paratuberculosis* in milk and phosphate buffer. *Int Dairy J*. **21**, 295-304.
183. van Embden, J., van Soolingen, D., Small, P., Hermans, P. (1992). Genetic markers for the epidemiology of tuberculosis. *Res Microbiol*. **143**, 385-391.
184. Vasavada, P., Chandler, R., Hull, R. (1993). Evolving methodologies for microbiological examination of milk and dairy foods. *Dairy, Food and Environmental Sanitation*. **13**, 510–515.
185. Vechiarelli, M., Zedde, A., Fiorentino, A., Cirone, K., Mosella, C., Paolicchi, F. (2010) Aislamiento de *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* de hígado y diafragma de cabras serológicamente positivas. XII Congreso Argentino de Microbiología, Buenos Aires, Argentina.
186. Wallace, R., Brown-Elliott, B., Wilson, R., Mann, L., Hall, L., Zhang, Y. (2004). Clinical and Laboratory Features of *Mycobacterium porcinum*. *J of Clinical Microbiol*. **42**, 5689–5697.
187. Wards, B., Collins, D., De Lisle, G. (1995). Detection of *Mycobacterium bovis* in tissues by polymerase chain reaction. *Vet Microbiol*. **43**, 227–240.
188. Wells, S. y Wagner, B. (2000). Herd-level risk factors for infection with *Mycobacterium paratuberculosis* in US dairies and association between familiarity of the herd manager with the

- disease or prior diagnosis of the disease in that herd and use of preventive measures. *J Am Vet Med Assoc.* **216**, 1450–1457.
189. Whan, L., Ball, H., Scott, R., Rowe, R. Can *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* exhibit cross-protection when subjected to stresses relevant to water treatment industry. Proceedings of the 7th International Colloquium on Paratuberculosis 2002, p.106, Bilbao, Spain.
190. Whan, L. Incidence and persistence of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in Northern Ireland water supplies. PhD Thesis 2004, Queen's University of Belfast, Belfast, UK.
191. Whipple, D., Kapke, P., Andersen, P. (1992). Comparison of a commercial DNA probe test and three cultivation procedures for detection of *Mycobacterium paratuberculosis* in bovine feces. *J Vet Diagn Invest.* **4**, 23-27.
192. Whittington, R., Marsh, I., Taylor, P., Marshall, D., Taragel, C., Reddacliff, L. (2003). Isolation of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* from environmental samples collected from farms before and after destocking sheep with paratuberculosis. *Aust Vet J.* **81**, 559–563.
193. Whittington, R., Marshall, D., Nicholls, P., Marsh, I., Reddacliff, L. (2004). Survival and dormancy of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in the environment. *Appl Environ Microbiol.* **70**, 2989-3000.
194. Wilinska, A., Bryjak, J., Illeová, V., Polakovi, M. (2007). Kinetics of thermal inactivation of alkaline phosphatase in bovine and caprine milk and buffer. *Int Dairy J.* **17**, 579-586.
195. Zapata Restrepo, M., Rodas Gonzáles, J., Maldonado Estrada, J. (2008). Paratuberculosis bovina: ¿conocemos la situación real de la enfermedad en la ganadería colombiana? *Rev Colom Cienc Pecuaria.* **21**, 420-435.
196. Zumárraga, M., Meikle, V., Bernardelli, A., Abdala, A., Tarabla, H., Romano, M., Catadi, A. (2005). Use of touch-down polymerase chain reaction to enhance the sensibility of *Mycobacterium bovis* detection. *J Vet Diagn Invest.* **17**, 232-238.

PARTE DE LOS RESULTADOS DE ESTA TESIS FUERON INCLUIDOS EN LAS SIGUIENTES PUBLICACIONES:

Publicaciones Científicas

- ✓ Cirone, K.; Huberman, Y.; Méndez, L.; Morsella, C.; Jorge, M.; Paolicchi, F. Growth of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*, *Escherichia coli*, and *Salmonella* Enteritidis during preparation and storage of yogurt. ISRN Microbiol. Volume 2013 (2013), Article ID 247018, 7 pages. <http://dx.doi.org/10.1155/2013/247018>

Publicaciones en Actas de Congresos

- ✓ Cirone K., Méndez L., Morsella C., Paolicchi F. “Viabilidad de *E. coli* y *S. enteritidis* durante la elaboración y almacenamiento tradicional de yogur”; Acta de III Congreso Latinoamericano de Zoonosis VI Congreso Argentino de Zoonosis; Junio de 2008, Ciudad de Buenos Aires, Argentina.
- ✓ Cirone K., Huberman, Y., Paolicchi F. “Viability of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* during traditional elaboration and storage of yogurt”; Proceeding of 10th International Colloquium on Paratuberculosis; August 2009, Minneapolis, Minnesota.
- ✓ Cirone K., Shimizu E., Fiorentino A., Morsella C., Spath E., Paolicchi F. “Calidad microbiológica de leches comerciales”, Acta de I Congreso Internacional de Zoonosis y Enfermedades Emergentes; Junio 2011, Buenos Aires, Argentina.
- ✓ Cirone K; Zumárraga M; Fiorentino A; Morsella C; Méndez L; Paolicchi F. “Aislamiento de *Mycobacterium porcinum* a partir de muestras de leche bovina de tanque de enfriado”, Acta de XIX Reunión Científico Técnica de la Asociación Argentina de Veterinarios de Laboratorios de Diagnóstico; Noviembre 2012, Buenos Aires, Argentina.
- ✓ Cirone K; Shimizu E; Fiorentino A; Morsella C; Méndez L; Paolicchi F. “Calidad microbiológica de leches comerciales”, Acta del XIII Congreso Argentino de Microbiología; Septiembre de 2013, Buenos Aires, Argentina.

APÉNDICE

1. Medios de cultivo

1.1. Medio Herrold con yema de huevo (H)

Composición (para 1000 mL de medio): Peptona (9,0 g) (Oxoid, Inglaterra), Cloruro de sodio (4,5 g), Agar (15,3 g) (Oxoid, Inglaterra), Extracto de carne vacuno (2,7 g) (Oxoid, Inglaterra), Glicerol (27,0 g) (J.T. Baker, México), Agua destilada (870 mL), yema de huevo (6).

Solución acuosa de Verde de Malaquita (forma oxálica) al 2 % (Sigma, Argentina), 5mL.

Se preparan asépticamente usando huevos frescos. Estos deben provenir de gallinas cuyas dietas no han contenido antibióticos.

Método de preparación: Mezclar y calentar todos los ingredientes excepto las yemas y la solución de verde malaquita, hasta que el agar se disuelva. Enfriar a 60°C y ajustar el pH a 7,5 con hidróxido de sodio 1N. Mezclar por agitación. Esterilizar en autoclave 25 minutos a 121°C, enfriar hasta conseguir una temperatura de 56 °C y agregar las 6 yemas preparadas de la siguiente forma:

Lavar los huevos con agua tibia y detergente y enjuagarlos con agua corriente. Dejarlos secar, y posteriormente sumergirlos en alcohol etílico 70% v/v durante 15 minutos. Romper cada huevo en forma aséptica, y colocar las yemas en el medio estéril del frasco fraccionador. Mezclar el medio suavemente, agregar la solución de verde malaquita con una pipeta estéril, mezclar otra vez. Distribuir asépticamente en los tubos, dejar que el medio solidifique, en posición inclinada. Comprobar la esterilidad incubando durante 48 hs a 37°C.

Siembra: Sembrar 4 gotas de muestra a lo largo del medio en pico de flauta.

Interpretación: Se consideran positivos aquellos tubos que presentan colonias aisladas a lo largo del tubo.

1.2. Medio de Herrold con yema de huevo y micobactina (HM)

Composición (para 1000 mL de medio): Peptona (9,0 g), Cloruro de sodio (4,5 g) (Biopack, Argentina), Agar (15,3 g), Extracto de carne vacuno (2,7 g), Glicerol (27,0 g), Agua destilada (870 mL), yema de huevo (6).

Preparación de la Micobactina: La micobactina (Allied Monitor: 2 mg) es disuelta en 4 mL de alcohol etílico. Esta cantidad es suficiente para preparar 1 litro de medio.

Método de preparación: Se prepara la solución compuesta por todos los componentes salvo las yemas y la solución de verde de malaquita, tal como se describió para el medio de Herrold con yema de huevo. Mezclar por agitación, y añadir la micobactina (Allied Monitor, USA), con una pipeta, dejándola caer directamente en el medio para que no toque la superficie interior del frasco. Autoclavar 20 minutos a 121 °C. Enfriar, a 56 °C y añadir asépticamente las 6 yemas estériles y 5 mL de solución de verde de malaquita al 2 % estéril. Mezclar todo en el frasco fraccionador y distribuir asépticamente en tubos. Dejar solidificar en posición inclinada.

Comprobar la esterilidad incubando el medio a 37°C durante 48 hs.

Nota: La micobactina puede agregarse como se describió anteriormente (antes del autoclavado), o bien, incorporarla en forma estéril previo al fraccionamiento, antes del agregado de la yema de huevo.

Siembra: Sembrar 4 gotas de muestra a lo largo del medio en pico de flauta.

Interpretación: Se consideran positivos aquellos tubos que presentan colonias aisladas a lo largo del tubo.

1.3. Medio de Herrold con yema de huevo + micobactina+ piruvato de sodio (HMP)

Composición (para 1000 mL de medio): Peptona (9,0 g), Cloruro de sodio (4,5 g), Agar (15,3 g), Extracto de carne vacuno (2,7 g), Glicerol (27,0 g), Piruvato de sodio (4g) (Sigma, Japón), Agua destilada (870 mL), yema de huevo (6).

Método de preparación: Se prepara de la misma manera que el medio madre (Herrold con yema de huevo).

Siembra: Sembrar 4 gotas de muestra a lo largo del medio en pico de flauta.

Interpretación: Se consideran positivos aquellos tubos que presentan colonias aisladas a lo largo del tubo.

Medio de Herrold con yema de huevo + micobactina + piruvato + antibióticos (HMPA)

Composición (para 1000 mL de medio): Peptona (9,0 g), Cloruro de sodio (4,5 g), Agar (15,3 g), Extracto de carne vacuno (2,7 g), Glicerol (27,0 g), Piruvato de sodio (4g), Agua destilada (870 mL), yema de huevo (6).

Método de preparación: Se prepara de la misma manera que el medio madre (Herrold con yema de huevo).

Antibióticos: 1- Anfotericina B (50 mg/1L del medio de cultivo) (Sigma, Israel); 2- Nistatina (100µg/1mL de medio de cultivo) (Sigma, Israel); 3- Vancomicina (100µg/1mL de medio de cultivo) (Sigma Aldrich, USA); 4- Ácido nalixdórico (3 mg/1mL de medio de cultivo) (Sigma, USA).

Siembra: Sembrar 4 gotas de muestra a lo largo del medio en pico de flauta.

Interpretación: Se consideran positivos aquellos tubos que presentan colonias aisladas a lo largo del tubo.

1.4. Löwenstein-Jensen

Composición: Fosfato mono potásico anhidro (PO₄H₂K) 2,4g; Sulfato de magnesio (SO₄Mg.7H₂O) 0,24g; Citrato de magnesio 0,6g; L-asparagina 3,6g; Glicerina 12mL; Agua destilada 600mL; Huevos enteros 1000mL (aprox 2 docenas); Solución verde de malaquita al 2% recién preparada (estéril) 20mL.

Método de preparación: Disolver las 3 primeras sales y la asparagina en 200mL de agua destilada. Calentar a baño María hasta disolución. Pasar a un frasco de 2000 mL de capacidad, agregar la glicerina y el agua destilada hasta completar 600 mL. Esterilizar en autoclave durante 20 minutos a 121°C y dejar enfriar a temperatura ambiente. Limpiar los huevos con un cepillo, agua y jabón y dejarlos durante algunos minutos en un recipiente con agua jabonosa. Enjuagarlos con agua corriente y limpiarlos con una gasa embebida en alcohol de 70% v/v. Volcar los huevos ya homogeneizados en el matraz que contiene la solución de sales, asparagina y glicerina y agregar la solución de verde de malaquita. Filtrar por el embudo estéril forrado con gasa y recibir el filtrado en el frasco fraccionador, cuidando de cerrar con una pinza de Mohr el tubo de goma de salida. Distribuir el medio utilizando la campana y la pinza de Mohr. Trabajar en forma estéril y evitar la formación de burbujas. Se distribuyen 7 mL en tubos de 17 x 170 ó 18 x 180 mm. Coagular el medio colocando los tubos en posición inclinada en un horno termorregulador o en un coagulador especial a 80°C durante 40 minutos. Terminada la coagulación, dejar enfriar los tubos 30 minutos y luego incubar a 37°C durante 24-48 hs. para controlar su esterilidad y eliminar el agua de condensación excesiva.

Siembra: Sembrar 4 gotas de muestra a lo largo del medio en pico de flauta.

Interpretación: Se consideran positivos aquellos tubos que presentan colonias aisladas a lo largo del tubo.

1.5. Stonebrink

Composición: Fosfato mono potásico anhidro (PO₄H₂K) 3,5g; Fosfato disódico (PO₄HNa₂H₂O) 2g; Piruvato de sodio 6,25g; agua destilada 500mL; Huevos enteros 1000mL (aprox. 2 docenas); Solución verde de malaquita al 2% recién preparada (estéril) 40mL.

Método de preparación: A 200 mL de agua destilada en un matraz de 1000mL de capacidad, agregar los fosfatos y el piruvato de sodio. Mezclar hasta obtener la disolución completa. Llevar a 500mL con agua destilada. Esterilizar en autoclave a 121°C durante 20 minutos. Dejar enfriar a temperatura ambiente. Continuar como en el medio Lowestein-Jensen.

Siembra: Sembrar 4 gotas de muestra a lo largo del medio en pico de flauta.

Interpretación: Se consideran positivos aquellos tubos que presentan colonias aisladas a lo largo del tubo.

1.6. Agar plate count

Composición (g/L): Pluripeptona 5; Extracto de carne 3; Cloruro de sodio 8; Agar 15. pH final: 7,3 +/- 0,2.

Método de preparación: Suspender 31g de polvo por litro de agua destilada. Mezclar al fuego hasta disolución total y dejar reposar 5 minutos. Autoclavar a 121°C durante 15 minutos.

Siembra: Colocar 1mL de muestra y verter 20mL del medio a 45°C. Homogeneizar y dejar solidificar. Invertir luego la posición de la placa para incubar a 37°C durante 48hs. Luego contar las colonias y expresar como UFC/mL.

2. Coloraciones

2.1. Tinción de ZN

Composición:

Fucsina: Fucsina básica (Arturo Hirschel y Cia., Argentina) al 3 % (v/v) (3 g en 100 mL de alcohol 96°). Fenol en cristal (Merck, Alemania) 50 g en 950 mL de H₂O destilada. Mezclar de la preparación stock de fucsina básica (10 mL) en 100 mL de fenol.

Alcohol clorhídrico: Alcohol 96° (970 mL) (Biopack, Argentina). Ácido clorhídrico (30 mL) (J.T. Baker, México).

Azul de Metileno: Azul de metileno, (1 g) (Biopack, argentina) en 100 mL de alcohol 96°. Hidróxido de potasio (1 g) (Biopack, Argentina) en 100 mL de H₂O destilada. Se toman 3 mL de la preparación de hidróxido de potasio y se agrega 297 mL de agua destilada, a ésta solución se le agrega 90 mL de la preparación de azul de metileno.

Método: El frotis se fija al calor, y se colorea con fucsina básica filtrada, se calienta con un hisopo hasta que se emitan vapores, dejando actuar 6 minutos. Se lava con agua y se decolora con alcohol clorhídrico, se lava nuevamente con agua. Se colorea con azul de metileno 30 segundos, se lava nuevamente y se deja secar.

3. Decontaminantes

3.1. HPC

Composición: Cloruro de 1-hexadecilpiridinium (Sigma, USA) al 0,75% o 1% (p/v) en agua destilada estéril.

3.2. Ácido Oxálico

Composición: Ácido oxálico (Anedra, Argentina) al 5 % (p/v) en agua destilada estéril.

4. Soluciones buffer

4.1. Buffer Salino (PBS)

Composición: cloruro de sodio 0,8% (p/v) (Biopack, Argentina), cloruro de potasio 0,02% (p/v) (Biopack, Argentina), fosfato de potasio 0,02% (p/v) (Mallinckrodt, USA) y fosfato de sodio 0,245% (p/v) (J.T. Baker, Mexico) en agua destilada.

Esterilizar en autoclave.

4.2. Buffer TE 10 X

Composición: 100 mM Tris/HCl, pH 8 y 10 mM EDTA. Disolver en agua destilada. Esterilizar en autoclave. Preparar buffer TE 1X adicionando a un volumen de buffer 10 X, 9 volúmenes de agua destilada estéril.

4.3. Buffer TAE 50 X

Composición: 242g Tris base, 57,1mL de ácido acético glacial y 37,2 g de EDTA. Disolver en 1 litro de agua destilada. Ajustar a pH 8.5. Esterilizar en autoclave. Preparar buffer 1X disolviendo en agua destilada estéril.

5. Conformación de pools de leche, quesos y yogures comerciales para extracción de ADN y posterior amplificación por hsp65-PCR

5.1. Pools de muestras positivas a ZN

POOL	MES/NRO	CONT GRASA	TRAT TERMICO	MARCA
1	S1	ENTERA	UP	2
	S3	ENTERA	UP	2
2	S7	ENTERA	UAT	2
	S9	ENTERA	UAT	2
3	S11	DESCREMADA	UAT	2
	S13	ENTERA	UP	1
4	S14	ENTERA	UP	1
	S19	ENTERA	UAT	1
5	S23	DESCREMADA	UAT	1
	O1	ENTERA	UP	2
6	O2	ENTERA	UP	2
	O3	ENTERA	UP	2
7	O7	ENTERA	UAT	2
	O8	ENTERA	UAT	2
8	O9	ENTERA	UAT	2
	O10	DESCREMADA	UAT	2
9	O12	DESCREMADA	UAT	2
	O13	ENTERA	UP	1
10	O14	ENTERA	UP	1
	O20	ENTERA	UAT	1
11	O21	ENTERA	UAT	1
	O22	DESCREMADA	UAT	1
12	N1	ENTERA	UP	2
	N3	ENTERA	UP	2
13	N9	ENTERA	UAT	2
	N10	DESCREMADA	UAT	2
14	N19	ENTERA	UAT	1
	N20	ENTERA	UAT	1
15	N24	DESCREMADA	UAT	1
	D3	ENTERA	UP	2
16	D5	DESCREMADA	UP	2

	D10	DESCREMADA	UAT	2
17	D13	ENTERA	UP	1
	D14	ENTERA	UP	1
18	D15	ENTERA	UP	1
	D16	DESCREMADA	UP	1
19	D18	DESCREMADA	UP	1
	D21	ENTERA	UAT	1
20	D23	DESCREMADA	UAT	1
	E1	ENTERA	UP	2
21	E2	ENTERA	UP	2
	E3	ENTERA	UP	2
22	E4	DESCREMADA	UP	2
	E8	ENTERA	UAT	2
23	E10	DESCREMADA	UAT	2
	E12	DESCREMADA	UAT	2
24	E20	ENTERA	UAT	1
	MR1	ENTERA	UP	2
25	MR4	ENTERA	UP	2
	MR5	ENTERA	UP	2
26	MR9	ENTERA	UAT	2
	MR12	DESCREMADA	UAT	2
27	MR13	ENTERA	UP	1
	MR16	DESCREMADA	UP	1
28	MR19	ENTERA	UAT	1
	MR20	ENTERA	UAT	1
29	MR23	DESCREMADA	UAT	1
	MR24	DESCREMADA	UAT	1
30	A1	ENTERA	UP	2
	A2	ENTERA	UP	2
31	A4	DESCREMADA	UP	2
	A6	DESCREMADA	UP	2
32	A7	ENTERA	UAT	2
	A8	ENTERA	UAT	2
33	A9	ENTERA	UAT	2
	A10	DESCREMADA	UAT	2
34	A11	DESCREMADA	UAT	2
	A12	DESCREMADA	UAT	2
35	A14	ENTERA	UP	1
	A17	DESCREMADA	UP	1
36	A22	DESCREMADA	UAT	1
	A24	DESCREMADA	UAT	1
37	MY1	ENTERA	UP	2
	MY4	DESCREMADA	UP	2
38	MY7	ENTERA	UAT	2
	MY10	DESCREMADA	UAT	2
39	MY12	DESCREMADA	UAT	2
	MY17	DESCREMADA	UP	1
40	MY18	DESCREMADA	UP	1
	MY19	ENTERA	UAT	1

41	MY22	DESCREMADA	UAT	1
	JN1	ENTERA	UP	2
42	JN4	ENTERA	UP	2
	JN7	ENTERA	UAT	2
43	JN9	ENTERA	UAT	2
	JN12	DESCREMADA	UAT	2
44	JN13	ENTERA	UP	1
	JN18	DESCREMADA	UP	1
45	JN19	ENTERA	UAT	1
	JN20	ENTERA	UAT	1
46	JN23	DESCREMADA	UAT	1
	JL1	ENTERA	UP	2
47	JL4	DESCREMADA	UP	2
	JL7	ENTERA	UAT	2
48	JL8	ENTERA	UAT	2
	JL9	ENTERA	UAT	2
49	JL11	DESCREMADA	UAT	2
	JL14	ENTERA	UP	1
50	JL15	ENTERA	UP	1
	JL17	DESCREMADA	UP	1
51	JL18	DESCREMADA	UP	1
	JL21	ENTERA	UAT	1
52	JL22	DESCREMADA	UAT	1
	AG2	ENTERA	UP	2
53	AG3	ENTERA	UP	2
	AG5	DESCREMADA	UP	2
54	AG6	DESCREMADA	UP	2
	AG7	ENTERA	UAT	2
55	AG9	ENTERA	UAT	2
	AG10	DESCREMADA	UAT	2
56	AG11	DESCREMADA	UAT	2
	AG12	DESCREMADA	UAT	2
57	AG13	ENTERA	UP	1
	AG15	ENTERA	UP	1
58	AG16	DESCREMADA	UP	1
	AG22	DESCREMADA	UAT	1
59	JN1	ENTERA	UP	2
	JN2	DESCREMADA	UP	2
60	JN4	DESCREMADA	UAT	2
	JL1	ENTERA	UP	2
61	JL2	DESCREMADA	UP	2
	JL3	ENTERA	UAT	2
62	JL4	DESCREMADA	UAT	2
	JL5	ENTERA	UP	1
63	JL7	ENTERA	UAT	1
	JL8	DESCREMADA	UAT	1
64	AG1	ENTERA	UP	2
	AG3	ENTERA	UAT	2
65	AG8	DESCREMADA	UAT	1

	S1	ENTERA	UP	2
66	S8	DESCREMADA	UAT	1
	O2	DESCREMADA	UP	2
67	O3	ENTERA	UAT	2
	O4	DESCREMADA	UAT	2
68	O5	ENTERA	UP	1
	O6	DESCREMADA	UP	1
69	O7	ENTERA	UAT	1
	O8	DESCREMADA	UAT	1
70	N1	ENTERA	UP	2
	N7	ENTERA	UAT	1
71	D1	DESCREMADA 1	UP	2
	D7	ENTERA	UAT	1
72	F3	ENTERA	UAT	2
	M1	ENTERA 1	UP	2
73	M3	ENTERA	UAT	2
	M4	DESCREMADA	UAT	2
74	M5	ENTERA	UP	1
	A1	ENTERA 1	UP	2
75	MY3	DESCREMADA	UAT	2
	MY7	ENTERA	UAT	1
76	JL9	ENTERO	Q	2
	AG10	DESCREMADO	Q	1
77	O9	ENTERO	Q	2
	O10	DESCREMADO	Q	2
78	D9	ENTERO	Q	1
	E10	DESCREMADO	Q	1
79	JL11	ENTERO	Y	1
	O11	ENTERO	Y	2
80	O12	DESCREMADO	Y	2

5.2. Pooles de muestras negativas a ZN

POOL	MES	CONT GRASA	TRAT TERMICO	MARCA	REPETICION
1	S2	ENTERA	UP	2	2
	S4	DESCREMADA	UP	2	1
	S5	DESCREMADA	UP	2	2
	S6	DESCREMADA	UP	2	3
	S8	ENTERA	UAT	2	2
2	S10	DESCREMADA	UAT	2	1
	S12	DESCREMADA	UAT	2	3
	S15	ENTERA	UP	1	3
	S16	DESCREMADA	UP	1	1
	S17	DESCREMADA	UP	1	2

3	S18	DESCREMADA	UP	1	3
	S20	ENTERA	UAT	1	2
	S21	ENTERA	UAT	1	3
	S22	DESCREMADA	UAT	1	1
	S24	DESCREMADA	UAT	1	3
4	O4	DESCREMADA	UP	2	1
	O5	DESCREMADA	UP	2	2
	O6	DESCREMADA	UP	2	3
	O11	DESCREMADA	UAT	2	2
	O15	ENTERA	UP	1	3
5	O16	DESCREMADA	UP	1	1
	O17	DESCREMADA	UP	1	2
	O18	DESCREMADA	UP	1	3
	O19	ENTERA	UAT	1	1
	O23	DESCREMADA	UAT	1	2
6	O24	DESCREMADA	UAT	1	3
	N2	ENTERA	UP	2	2
	N4	DESCREMADA	UP	2	1
	N5	DESCREMADA	UP	2	2
	N6	DESCREMADA	UP	2	3
7	N7	ENTERA	UAT	2	1
	N8	ENTERA	UAT	2	2
	N11	DESCREMADA	UAT	2	2
	N12	DESCREMADA	UAT	2	3
	N13	ENTERA	UP	1	1
8	N14	ENTERA	UP	1	2
	N15	ENTERA	UP	1	3
	N16	DESCREMADA	UP	1	1
	N17	DESCREMADA	UP	1	2
	N18	DESCREMADA	UP	1	3
9	N21	ENTERA	UAT	1	3
	N22	DESCREMADA	UAT	1	1
	N23	DESCREMADA	UAT	1	2
	D1	ENTERA	UP	2	1
	D2	ENTERA	UP	2	2
10	D4	DESCREMADA	UP	2	1
	D6	DESCREMADA	UP	2	3
	D7	ENTERA	UAT	2	1
	D8	ENTERA	UAT	2	2
	D9	ENTERA	UAT	2	3
11	D11	DESCREMADA	UAT	2	2
	D12	DESCREMADA	UAT	2	3
	D17	DESCREMADA	UP	1	2
	D19	ENTERA	UAT	1	1
	D20	ENTERA	UAT	1	2
12	D22	DESCREMADA	UAT	1	1
	D24	DESCREMADA	UAT	1	3
	E5	DESCREMADA	UP	2	

	E6	DESCREMADA	UP	2	
	E7	ENTERA	UAT	2	
13	E9	ENTERA	UAT	2	3
	E11	DESCREMADA	UAT	2	2
	E13	ENTERA	UP	1	1
	E14	ENTERA	UP	1	2
	E15	ENTERA	UP	1	3
14	E16	DESCREMADA	UP	1	1
	E17	DESCREMADA	UP	1	2
	E18	DESCREMADA	UP	1	3
	E19	ENTERA	UAT	1	1
	E21	ENTERA	UAT	1	3
15	E22	DESCREMADA	UAT	1	1
	E23	DESCREMADA	UAT	1	2
	E24	DESCREMADA	UAT	1	3
	F1	ENTERA	UP	2	1
	F2	ENTERA	UP	2	2
16	F3	ENTERA	UP	2	3
	F4	DESCREMADA	UP	2	1
	F5	DESCREMADA	UP	2	2
	F6	DESCREMADA	UP	2	3
	F7	ENTERA	UAT	2	1
17	F8	ENTERA	UAT	2	2
	F9	ENTERA	UAT	2	3
	F10	DESCREMADA	UAT	2	1
	F12	DESCREMADA	UAT	2	3
	F13	ENTERA	UP	1	1
18	F14	ENTERA	UP	1	2
	F15	ENTERA	UP	1	3
	F16	DESCREMADA	UP	1	1
	F17	DESCREMADA	UP	1	2
	F18	DESCREMADA	UP	1	3
19	F19	ENTERA	UAT	1	1
	F20	ENTERA	UAT	1	2
	F21	ENTERA	UAT	1	3
	F22	DESCREMADA	UAT	1	1
	F23	DESCREMADA	UAT	1	2
20	F24	DESCREMADA	UAT	1	3
	MR2	ENTERA	UP	2	2
	MR3	ENTERA	UP	2	3
	MR6	ENTERA	UP	2	3
	MR7	ENTERA	UAT	2	1
21	MR8	ENTERA	UAT	2	2
	MR10	DESCREMADA	UAT	2	1
	MR11	DESCREMADA	UAT	2	2
	MR14	ENTERA	UP	1	2
	MR15	ENTERA	UP	1	3
22	MR17	DESCREMADA	UP	1	2
	MR18	DESCREMADA	UP	1	3

	MR21	ENTERA	UAT	1	3
	MR22	DESCREMADA	UAT	1	1
	A3	ENTERA	UP	2	3
23	A5	DESCREMADA	UP	2	2
	A13	ENTERA	UP	1	1
	A15	ENTERA	UP	1	3
	A16	DESCREMADA	UP	1	1
	A18	DESCREMADA	UP	1	3
24	A19	ENTERA	UAT	1	1
	A20	ENTERA	UAT	1	2
	A21	ENTERA	UAT	1	3
	A23	DESCREMADA	UAT	1	2
	MY2	ENTERA	UP	2	2
25	MY3	ENTERA	UP	2	3
	MY5	DESCREMADA	UP	2	2
	MY6	DESCREMADA	UP	2	3
	MY8	ENTERA	UAT	2	2
	MY9	ENTERA	UAT	2	3
26	MY11	DESCREMADA	UAT	2	2
	MY13	ENTERA	UP	1	1
	MY14	ENTERA	UP	1	2
	MY15	ENTERA	UP		3
	MY16	DESCREMADA	UP	1	1
27	MY20	ENTERA	UAT	1	2
	MY21	ENTERA	UAT	1	3
	MY23	DESCREMADA	UAT	1	2
	MY24	DESCREMADA	UAT	1	3
	JN2	ENTERA	UP	2	2
28	JN3	ENTERA	UP	2	3
	JN5	ENTERA	UP	2	5
	JN6	ENTERA	UP	2	6
	JN8	ENTERA	UAT	2	2
	JN10	DESCREMADA	UAT	2	1
29	JN11	DESCREMADA	UAT	2	2
	JN14	ENTERA	UP	1	2
	JN15	ENTERA	UP	1	3
	JN16	DESCREMADA	UP	1	1
	JN17	DESCREMADA	UP	1	2
30	JN21	ENTERA	UAT	1	3
	JN22	DESCREMADA	UAT	1	1
	JN24	DESCREMADA	UAT	1	3
	JL2	ENTERA	UP	2	2
	JL3	ENTERA	UP	2	3
31	JL5	DESCREMADA	UP	2	2
	JL6	DESCREMADA	UP	2	3
	JL10	DESCREMADA	UAT	2	1
	JL12	DESCREMADA	UAT	2	3
	JL13	ENTERA	UP	1	1
32	JL16	DESCREMADA	UP	1	1

	JL19	ENTERA	UAT	1	1
	JL20	ENTERA	UAT	1	2
	JL23	DESCREMADA	UAT	1	2
	JL24	DESCREMADA	UAT	1	3
33	AG1	ENTERA	UP	2	1
	AG4	DESCREMADA	UP	2	1
	AG8	ENTERA	UAT	2	2
	AG14	ENTERA	UP	1	2
	AG17	DESCREMADA	UP	1	2
34	AG18	DESCREMADA	UP	1	3
	AG19	ENTERA	UAT	1	1
	AG20	ENTERA	UAT	1	2
	AG21	ENTERA	UAT	1	3
	AG23	DESCREMADA	UAT	1	2
35	AG24	DESCREMADA	UAT	1	3
	JN3	ENTERA	UAT	2	
	JN5	ENTERA	UP	1	
	JN6	DESCREMADA	UP	1	
	JN7	ENTERA	UAT	1	
36	JN8	DESCREMADA	UAT	1	
	JL6	DESCREMADA	UP	1	
	AG2	DESCREMADA	UP	2	
	AG4	DESCREMADA	UAT	2	
	AG5	ENTERA	UP	1	
37	AG6	DESCREMADA	UP	1	
	AG7	ENTERA	UAT	1	
	S2	DESCREMADA	UP	2	
	S3	ENTERA	UAT	2	
	S4	DESCREMADA	UAT	2	
38	S5	ENTERA	UP	1	
	S6	DESCREMADA	UP	1	
	S7	ENTERA	UAT	1	
	O1	ENTERA	UP	2	
	N2	ENTERA	UP	2	
39	N3	ENTERA	UAT	2	
	N4	DESCREMADA	UAT	2	
	N5	ENTERA	UP	1	
	N6	DESCREMADA	UP	1	
	N8	DESCREMADA	UAT	1	
40	D2	DESCREMADA	UP	2	
	D3	DESCREMADA	UAT	2	
	D4	ENTERA	UAT	2	
	D5	ENTERA	UP	1	
	D6	DESCREMADA	UP	1	
41	D8	DESCREMADA	UAT	1	
	E1	ENTERA	UP	2	
	E2	DESCREMADA	UP	2	
	E3	DESCREMADA	UAT	2	
	E4	ENTERA	UAT	2	

42	E5	ENTERA	UP	1	
	E6	DESCREMADA	UP	1	
	E7	ENTERA	UAT	1	
	E8	DESCREMADA	UAT	1	
	F1	ENTERA	UP	2	
43	F2	DESCREMADA	UP	2	
	F4	DESCREMADA	UAT	2	
	F5	ENTERA	UP	1	
	F6	DESCREMADA	UP	1	
	F7	ENTERA	UAT	1	
44	F8	DESCREMADA	UAT	1	
	M2	DESCREMADA	UP	2	
	M6	DESCREMADA	UP	1	
	M7	ENTERA	UAT	1	
	M8	DESCREMADA	UAT	1	
45	A2	ENTERA	UP	2	
	A3	DESCREMADA	UAT	2	
	A4	ENTERA	UAT	2	
	A5	ENTERA	UP	1	
	A6	DESCREMADA	UP	1	
46	A7	ENTERA	UAT	1	
	A8	DESCREMADA	UAT	1	
	MY1	DESCREMADA	UP	2	
	MY2	DESCREMADA	UP	2	
	MY4	ENTERA	UAT	2	
47	MY5	ENTERA	UP	1	
	MY6	DESCREMADA	UP	1	
	MY8	DESCREMADA	UAT	1	
48	JN9	ENTERO	Q	1	
	JN10	DESCREMADO	Q	1	
	JL10	DESCREMADO	Q	2	
	AG9	ENTERO	Q	1	
	S9	ENTERO		1	
49	S10	DESCREMADO	Q	1	
	N9	ENTERO	Q	1	
	N10	DESCREMADO	Q	1	
	D10	DESCREMADO	Q	1	
	E9	ENTERO	Q	1	
50	F9	ENTERO	Q	2	
	F10	DESCREMADO	Q	2	
	M9	ENTERO	Q	2	
	M10	DESCREMADO	Q	2	
	A9	ENTERO	Q	1	
51	A10	DESCREMADO	Q	1	
	MY9	ENTERO	Q	1	

	MY10	DESCREMADO	Q	1	
52	JN11	ENTERO	Y	2	
	JN12	DESCREMADO	Y	2	
	JL12	DESCREMADO	Y	1	
	AG11	ENTERO	Y	1	
	AG12	DESCREMADO	Y	1	
53	S11	ENTERO	Y	2	
	S12	DESCREMADO	Y	2	
	N11	ENTERO	Y	1	
	N12	DESCREMADO	Y	1	
	D11	ENTERO	Y	2	
54	D12	DESCREMADO	Y	2	
	E11	ENTERO	Y	1	
	E12	DESCREMADO	Y	1	
	F11	ENTERO	Y	2	
	F12	DESCREMADO	Y	2	
55	M11	ENTERO	Y	1	
	M12	DESCREMADO	Y	1	
	A11	ENTERO	Y	2	
	A12	DESCREMADO	Y	2	
	MY11	ENTERO	Y	1	
	MY12	DESCREMADO	Y	1	