

# **PASTEURIZACION DE LECHE DESTINADA A TERNEROS: EFECTO SOBRE LA INACTIVACION DE *Mycobacterium avium* subsp *paratuberculosis*.**

**Paolicchi, F.<sup>1,2</sup>; Morsella, C.<sup>1</sup>; Cipolla, A.<sup>1</sup>; Seguro, R.<sup>3</sup>; González, A.<sup>4</sup>**

1. Laboratorio de Bacteriología, Departamento de Producción Animal, EEA INTA. 2. Facultad de Ciencias Agrarias, UNMdP. CC276, (7620) Balcarce. 3. Asesor Agropecuario Privado, Esperanza, Santa Fe. 4. Facultad de Veterinaria, UNL, Santa Fe. ARGENTINA.

Dirección Correspondencia: Fernando Paolicchi, Grupo de Sanidad Animal, EEA INTA Balcarce y Facultad de Ciencias Agrarias UNMdP. CC 276 Balcarce (7620), Provincia de Buenos Aires. TE 02266 439 121. E-mail: [fpolicchi@balcarce.inta.gov.ar](mailto:fpolicchi@balcarce.inta.gov.ar)

## Resumen

Se evaluó la eficacia de un pasteurizador comercial de uso en tambos para eliminar *Mycobacterium avium* subsp *paratuberculosis* (*Map*) en leche cruda bovina. El equipo utilizado fue un pasteurizador de placas con un régimen de 300 litros por hora. Se efectuaron 3 tratamientos de pasteurización durante 15 seg., 30 seg. y 60 seg. a una misma temperatura de 72,5 °C. Se utilizó leche proveniente de un tambo libre de Tuberculosis y Paratuberculosis. La leche fue inoculada con dos cepas de *Map* ( $2,9 \times 10^6$  UFC/mL) y con una cepa de *Mycobacterium phlei* ( $4 \times 10^4$  UFC/mL). Se recolectaron 200 mL de muestras de leche por duplicado en recipientes estériles desde: a) leche cruda, b) leche cruda sometida a pasteurización tradicional, c) leche cruda inoculada con *Map*, d) leche cruda inoculada y sometida a pasteurización con 72,5 °C por 15", 72,5 °C por 30" o, 72,5 °C por 60". Las muestras tomadas se dividieron en dos partes, una fue cultivada directamente sin tratamiento previo y la otra parte fue previamente descontaminada con hexadecilpiridinium 0,75% por 5 hs. Las muestras se cultivaron en medio Herrold con micobactina y piruvato (HEYMP) en placas de Petri para la identificación de *Map* y de *M.phlei*. Las muestras de leche cruda proveniente del tambo resultaron negativas al cultivo de cualquier micobacteria mientras que desde la leche inoculada no pasteurizada se recuperaron *Map* y *M.phlei* en pureza. Por el contrario, no se observó desarrollo de colonias de micobacterias en HEYMP en ninguna de las leches sometidas a diferentes tratamientos de pasteurización. Los resultados preliminares de este estudio en estas condiciones, evidencian eficiencia del pasteurizador utilizado, para la eliminación de micobacterias como las estudiadas aquí a partir de leche cruda. No se observaron diferencias utilizando cualquiera de los tres tiempos de pasteurización con lo cual el proceso y el equipo aseguraría eliminar los patógenos en el menor tiempo contribuyendo a preservar las características nutritivas de la leche. Resulta importante el control de *Map* en la leche destinada a la alimentación de terneros en guacheras, para evitar riesgos de transmisión de Paratuberculosis. Para esto deberían realizarse otros trabajos con diferentes temperaturas y tiempos de exposición al tratamiento térmico de leche con *Map*.

**Palabras Clave:** paratuberculosis, leche, terneros, pasteurizador.

# **PASTEURIZATION OF BOVINE MILK TO FOOD CALVES: EFFECT ON INACTIVATION OF *Mycobacterium avium* subsp *paratuberculosis*.**

**Paolicchi, F.<sup>1,2</sup>; Morsella, C.<sup>1</sup>; Cipolla, A.<sup>1</sup>; Seguro, R.<sup>3</sup>; González, A.<sup>4</sup>**

1. Laboratorio de Bacteriología, Departamento de Producción Animal, EEA INTA. 2. Facultad de Ciencias Agrarias, UNMdP. CC276, (7620) Balcarce. 3. Asesor Agropecuario Privado, Esperanza, Santa Fe. 4. Facultad de Veterinaria, UNL, Santa Fe. ARGENTINA.

## **Summary**

The efficiencies of commercial dairy farm pasteurizer equipment were evaluated in order to eliminating *Mycobacterium avium subsp paratuberculosis* (Map) in raw bovine milk. The pasteurization equipment was built with plates for a 300 liters/hour regime. Three pasteurization treatments were brought up for a 15', 30' and 60' period of time at same temperature of 72,5°C. Milk, Tuberculosis and Paratuberculosis free, coming from a Santa Fe Province was used. Milk was inoculated with two Map strains ( $2,9 \times 10^6$  UFC/mL) as well as one *Mycobacterium phlei* strains ( $4 \times 10^4$  UFC/mL), and 200 mL of milk in duplicate were collected in sterile recipients from: a) raw milk, b) inoculated raw milk subjected to traditional pasteurization treatment at 72,5°C for 15'', 72,5°C for 30'', or 72,5° C for 60''. The taken samples were divided in two sections: the first one cultivated directly out of previous treatment, the second previously decontaminated with hexadecilpiridinium 0,75% for 5 hs. The samples were cultivated in a Herrold's media with mycobactin J and piruvate (HEYMP) into Petri packs for further Map and *M. phlei* identification. The raw milk samples coming from a dairy farm resulted negative to whatever mycobacteria culture while from inoculated milk but no pasteurized Map and *M.phlei* in purity was observed. On the contrary, no

mycobacterium colonies were observed in HEYMP, in any of milk samples submitted to different pasteurization treatments. Preliminary results in this study under present conditions show a great equipment efficiency used to eliminate mycobacterium, such been studied from raw milk. No great differences were observed using whatever of three pasteurization times wherewith the process and equipment would assure the pathogens removal in les time contributing to preserving milk nutrient characteristics. Should be taken under account the control of Map in milk for calf in pens feeding to avoid Paratuberculosis transmission risk. Further works should be carried out under different temperatures and exposures to milk thermo treatment with Map.

**Keywords: Paratuberculosis, milk, calves, pasteurizer.**

### Introducción

La paratuberculosis (PTBC) o enfermedad de Johne es una enfermedad infecciosa producida por *Mycobacterium avium* subsp *paratuberculosis* (Map). La enfermedad se caracteriza por una enteritis crónica, con síntomas como diarrea intermitente, desmejoramiento progresivo y finalmente la muerte del animal enfermo. La enfermedad produce significativas pérdidas económicas a los productores y a la industria lactea, estimados en 250 millones de dólares por año en USA y aproximadamente 28 millones de dólares por año en Argentina (Paolicchi et al, 2003). Esta pérdida se debe a costos directos e indirectos que produce la enfermedad tales como mortandad de animales enfermos, disminución de la producción lactea, disminución de los índices de preñez, mala conversión alimenticia, perdida del valor genético y gastos asociados al reemplazo prematuro y venta de animales a faena en mal estado corporal (Hasanova and Pavlik, 2006).

LA PTBC ha sido correlacionada con disminución de la producción láctea y disminución de componentes como proteínas y grasa de la leche, aunque no necesariamente con alteración del conteo de células somáticas en leche y un costo final incrementado a causa de la presencia de animales infectados (Collins et al, 1996; Gonda et al, 2007)

El agente etiológico de la PTBC ha sido aislado en un amplio rango de especies domésticas, ambientes ecológicos diversos y en la fauna silvestre o animales de parques zoológicos como cabras, ciervos blancos, ciervos rojos, alces, muflones, camellos, ovinos, gnus, búfalos, llamas, siendo la especie más estudiada el bovino.

La prevalencia de la PTBC en Europa oscila entre un 7% y un 55%, en los Estados Unidos alcanza un 40% de los rodeos de más de 300 cabezas y en Australia la prevalencia en los rodeos lecheros se encuentra entre un 9 y un 22%. En Argentina, datos recogidos por el grupo de investigación del INTA Balcarce, indican una seroprevalencia que varían entre 7,2 y 19,6% en rodeos de cría de la Cuenca del Salado en la provincia de Buenos Aires. La epidemiología está ligada a las características biológicas de *Map*, lento desarrollo, parasitismo obligado, alta resistencia ambiental, posibilidad de infección congénita y transmisión a través de la leche (Paolicchi et al, 2003).

Muchos de los tambos en Argentina como en el resto del mundo utilizan leche fresca para alimentar a sus terneros. Esta práctica tiene ventajas económicas pero puede acarrear el problema del incremento de la morbilidad y mortalidad de los terneros a causa de la ingestión de agentes patógenos tales como *Map*. Por otro lado, la leche de vacas mastíticas es frecuentemente utilizada para la alimentación de los terneros y puede contener patógenos como *Map* (Ellingson et al, 2005). Las vacas infectadas con *Map* excretan la bacteria en el calostro y en la leche y esto constituye un riesgo para la transmisión de la enfermedad a los terneros (Sweeney et al, 1992, Streeter et al, 1995). La transmisión de PTBC desde las madres infectadas se produce con una mínima cantidad de estos microorganismos, suficiente para infectar a los terneros que desarrollaran posteriormente la enfermedad (Chiodini et al, 1984). Aunque la excreción de *Map* desde la glándula mamaria de vacas infectadas es intermitente, resulta en un potencial riesgo de contagio cuando los terneros son alimentados diariamente con leche infectada proveniente de varias vacas paratuberculosas. La ingestión de leche proveniente de vacas sanas o de vacas no infectadas de rodeos comprobadamente libres de paratuberculosis es el método ideal para evitarlo. La leche bovina que se suministra a los terneros normalmente es administrada en la guachera sin tratamiento térmico de alta temperatura. Por otro lado, no siempre suele

diagnosticarse correctamente el status de PTBC en forma individual, desconociendo de esta forma aquellos animales positivos y excretores de la bacteria en leche.

Una de las alternativas para minimizar estos riesgos, es el uso de un sistema de pasteurización de la leche cruda previo a la alimentación de los terneros, para destruir los posibles patógenos como *Map*. Se conoce que la leche bovina calentada a 65.5°C por 10 min. sería suficiente para destruir patógenos como *Map* (Stabel, 2001). También se ha demostrado que la resistencia de las micobacterias al calor es diferente entre ellas, incluyendo a *M. bovis*, *M. avium*, *M. intracellulare*, *M. gordonae*, *M. kansasii*, *M. smegmatis* y *M. phlei*, siendo *M.bovis* la de mas baja termoresistencia en exposición a 60°C/16 min. o 70°C-75°C/10 seg., mientras que *M. phlei* presenta la mas alta termoresistencia entre las micobacterias estudiadas, tolerando hasta 20 segundos a 75°C (Pavlas, 1990).

Algunos trabajos destinados a estudiar la sobrevivencia de *Map* en la leche pasteurizada comercial para alimentación humana, ha provocado preocupación en la comunidad, ya que esta micobacteria fue aislada en humanos y ha sido implicada en el desarrollo de la Enfermedad de Crohn una enteropatía de similares características a la presente en los animales con PTBC (Hermon Taylor, 2000; Naser et al, 2000; Greenstein, R., 2003; Sullivan, 2005)). En los últimos años se han reportado entre el 1,6% y el 2,9% de aislamientos de *Map* en leches comerciales destinadas al consumo humano (Grant et al, 2002a, Ayele et al, 2005, Hruska et al, 2005, Ellingson et al, 2005, Paolicchi et al, 2005) y estos resultados indicarían que las condiciones de pasteurización de leche comercial no siempre son eficientes para eliminar a *Map* de la leche (Millar et al, 1996).

Varios investigadores probaron diferentes tipos de pasteurizadores de flujo continuo turbulento a escala comercial para identificar la sobrevivencia de *Map* a las condiciones de pasteurización tanto en la industria láctea como en los tambos (Grant et al, 1998, Grant et al, 2002b, Gao et al, 2002).

Desde al punto de vista de la PTBC como enfermedad del rodeo lechero sería deseable controlar la transmisión de la enfermedad y para ello una herramienta útil sería el uso de un pasteurizador eficiente para cortar la cadena de transmisión del patógeno a los

terneros alimentados con leche fresca, como se ha demostrado en otros trabajos (Ellingson et al, 1996).

El objetivo de este trabajo fue evaluar la eficacia de un pasteurizador comercial de uso en los tambos para el tratamiento térmico de la leche destinada a la alimentación de terneros, estudiando la eliminación de *Map* a partir de leche bovina inoculada experimentalmente y utilizando *M. phlei* para evaluar supervivencia por presentar mayor termoresistencia.

## Materiales y Métodos

**Equipo Pasteurizador:** fue utilizado un pasteurizador comercial de leche para terneros de fabricación nacional (Industrias Bossio, Argentina), instalado en la localidad de El Trébol, Provincia de Santa Fé, Argentina. Para este trabajo se optó por utilizar un régimen de trabajo de 300 litros de leche/hora a una temperatura constante de 72,5°C.

**Tratamientos:** se realizaron 3 diferentes tratamientos de pasteurización: 1) 72,5 °C por 15 seg., 2) 72,5 °C por 30 seg. o, 3) 72,5 °C por 60 seg. Entre cada tratamiento, el equipo fue sometido a lavado con solución desinfectante utilizada rutinariamente en tambos y posteriormente 4 enjuagues para asegurar la limpieza y neutralización del circuito. Para cada tratamiento, repetido dos veces, se efectuaron cambios en el largo de los caños por donde fluye la leche variando de esta forma el tiempo de exposición de la misma.

### **Inóculos utilizados:**

***M. paratuberculosis:*** dos cepas de *Map* (M-505 y DM-94/494) pertenecientes a la colección de INTA Balcarce fueron seleccionadas para el inóculo. Las cepas fueron originalmente aisladas desde leche bovina y materia fecal respectivamente de animales con PTBC clínica y ELISA positivo en suero. Las mismas fueron posteriormente caracterizadas por dependencia a la micobactina sobre medio Herrold, microscopia en frotis coloreados con Ziehl Neelsen, PCR para identificación de segmento de inserción característico IS900 y tipificadas por RFLP para identificación de patrón genotípico "A" para la cepa M-505 y "B" para DM-94/494. Los inóculos de *Map* fueron propagados sobre medio Herrold-yema de

huevo con 2 mg/L micobactina (Allied Monitor, Fayette, USA) y piruvato de sodio (HEYMP) mas 0.05% de Tween 80 estéril (Sigma Chemical, USA). La concentración de los inóculos fue calculada por medio de espectrofotometría a 620 nm. Las células fueron centrifugadas a 3500 rpm por 20 min., lavadas con buffer fosfato (PBS) pH 7.4 y resuspendidas hasta alcanzar la concentración de  $2 \times 10^6$  UFC/mL previo a su inoculación en la leche cruda.

**M. phlei:** una cepa de *M. phlei* estándar proveniente de la colección de INTA Balcarce, tipificada por métodos de cultivo, morfología de las colonias y bioquímicas fue utilizada para inocular la leche cruda. La misma fue propagada en medio Herrold bajo un esquema similar al de *Map*. La concentración final para esta cepa fue de  $4 \times 10^4$  UFC/ml de leche previo a su inoculación en la leche cruda.

Para la inoculación de la leche ambos inóculos de micobacterias se resuspendieron en 500 mL de leche cruda y posteriormente fueron agregados al total de 50 L de leche manteniendo agitación permanente antes de ser sometidos a los diferentes tratamientos de pasteurización.

Los recuentos bacterianos individuales de ambos inóculos y de la leche cruda inmediatamente después de inoculada, se realizaron en duplicado mediante el método de Miles y Misra por microdilución sobre HEYMP en placas de Petri. Los resultados de los recuentos fueron observados definitivamente a los 30 días del cultivo.

**Muestras:** se utilizaron 50 Lts de leche cruda del primer ordeño proveniente de un tambo de la zona de Esperanza, Santa Fe, libre de Tuberculosis y sin antecedentes de Paratuberculosis clínica o por ELISA en suero. Las alícuotas de leche para el estudio fueron: A) una alícuota de 500 mL de leche cruda extraída previamente y conservada como control negativo de cultivo. B) otra alícuota de 500 mL de leche cruda no inoculada sometida a tratamiento térmico previo a la inoculación de la leche y luego recolectada a la salida del equipo después de la pasteurización tradicional a  $72,5^{\circ}\text{C}$  por 15 seg. El resto de la leche cruda fue sometida a la inoculación experimental con el nivel apropiado de los patógenos *Map* y *M. phlei* como se describe mas adelante y se tomaron otras alícuotas como: C) una alícuota de 500 mL de leche cruda previamente homogeneizada conservada como control positivo de cultivo inoculado no tratado por pasteurización. D) tres alícuotas de 500 mL cada



una de la leche remanente inoculada tomada y luego sometida a los tratamientos con 72,5°C por 15 seg., 72,5°C por 30 seg. y 72,5°C por 60 seg. recolectando las mismas por triplicado en envases estériles. Todas las muestras fueron mantenidas bajo refrigeración a 4°C hasta su procesamiento para cultivo 12hs posteriores.

**Estudios bacteriológicos:** las muestras de leche cruda no inoculada, leche inoculada sin tratamiento térmico y muestras de leche inoculada y sometida a pasteurización con los diferentes tratamientos, fueron centrifugadas (200 mL) a 2000 rpm por 20 min. y el pellet resuspendido en buffer fosfato salino pH 7.4 para aquellas muestras sometidas a cultivo directo sin decontaminación previa o, resuspendido en hexadecilpiridinium (HPC) 0,75% (Sigma Chemical, USA) previo al cultivo e incubadas por 5 hs. Todas las muestras de leche fueron posteriormente centrifugadas a 2000 rpm por 20 min., el pellets resuspendido en buffer fosfato salino pH 7.4 (PBS) y fueron cultivadas sobre medio HEYMP sin antibióticos, para evidenciar la presencia de las micobacterias inoculadas. Los cultivos de HEYMP fueron mantenidos a 37°C y observados diariamente para identificación del desarrollo de *M. phlei* hasta los 45 días pos pasteurización y cada 15 días hasta los 4 meses pos pasteurización para la identificación de colonias de *Map*. Las colonias desarrolladas en los medios de HEYMP similares a *Map* fueron confirmadas por PCR identificando la secuencia de inserción típica IS900 de *Map* y posteriormente sometidas a RFLP como ha sido descrito previamente (Moreira et al, 1999). Las colonias similares a *M.phlei* fueron identificadas por observación microscópica con tinción de ZN y bioquímicas de rutina según el Manual Standard de procedimiento para Micobacterias.

## Resultados

Las muestras de leche cruda provenientes del tambo tomadas antes de cualquier tratamiento resultaron negativas al cultivo de micobacterias. Desde las muestras de leche inoculada no pasteurizada se recuperaron *Map* y *M. phlei* sobre el medio HEYMP tanto en las leches sin decontaminación previa como en aquellas sometidas a decontaminación con HPC 0.75%, identificando en ambos casos un número similar de colonias ( $\geq 50$  UFC) en el HEYMP. Las cepas visibles con características morfológicas de *Map* aisladas desde la leche

inoculada no tratada por pasteurización, fueron caracterizadas por el tipo de colonia y la tinción positiva con Zhiel Neelsen y resultaron positivas al PCR IS900.

En las muestras de leche sometidas a pasteurización con 72,5°C bajo cualquiera de los 3 diferentes tratamientos, no fueron recuperadas micobacterias en el cultivo de HEYMP. A pesar de no evidenciar macroscopicamente desarrollo de colonias en los medios de cultivo, las muestras tomadas con ansa desde la superficie de todos los tubos conteniendo HEYMP fue analizada por PCR IS900 para detectar algún desarrollo de micobacterias no visible, pero el análisis resultó negativo en todos los casos, demostrando que no existió desarrollo de *Map* en HEYMP. En la Tabla 1 se registran los resultados del estudio bacteriológico.

### Conclusiones

Los resultados preliminares del estudio indican que el equipo pasteurizador comercial utilizado bajo estas condiciones experimentales sería eficiente para eliminar de la leche micobacterias como *Map* y *M. phlei*. No fueron observadas diferencias utilizando cualquiera de los tres diferentes tiempos de pasteurización a 72,5 °C, por lo que la pasteurización de leche solo por 15 seg. sería adecuada para eliminar *Map* y *M. phlei* reduciendo el tiempo de contacto de la leche con el calor.

La mayor frecuencia de aislamientos bacterianos en leche provenientes de tambos en la Argentina le corresponde a los géneros *Staphilococcus spp*, *Streptococcus spp*, *Escherichia coli*, entre otros, pero informes de frecuencia de aislamientos de *Map* en Argentina no se encontraron en la bibliografía consultada.

*Map* puede ser eliminado en la leche por vacas con PTBC (Stabel et al, 1997, Streeter et al, 1995, Sweeney et al, 1992, Taylor et al, 1981). En estudios de laboratorio ha sido demostrado que *Map* puede sobrevivir a las condiciones de pasteurización con equipos comerciales (Chiodini and Hermon Taylor, 1993, Grant et al, 1996, Meylan et al, 1996, Grant et al, 1997, Grant et al, 1999, Sung and Collins, 1998). En otros estudios *Map* ha sido controlado y destruido por pasteurizadores similares al usado en nuestro trabajo con régimen de flujo de leche 300 lts por hora a 65 °C por 30 min. (Stabel, 2001) o por 71,5 °C

por 15 seg. (Stabel et al, 2004). También el calostro ha sido estudiado y sometido a pasteurización con equipos comerciales similares al usado en nuestro trabajo (Pearce et al 2002), resultando efectivo para destruir *Map* pero reduciendo negativamente hasta 25% el total de inmunoglobulinas presentes en el calostro (Stabel et al, 2004).

En trabajos experimentales con leche infectada con *Map*, se demostró que el flujo turbulento de los pasteurizadores es la clave para la completa muerte de este microorganismo, ya que esta bacteria forma agrupaciones compactas denominadas *clumps* de entre 20 y 40 células en forma de ovillo que las protege del calor, principalmente cuando estas agrupaciones circulan por el centro del flujo de leche en un sistema lineal y no turbulento, como se ha descrito para algunos pasteurizadores (Stabel et al, 1997).

Resulta importante el control de estos microorganismos en leche destinada a la alimentación de terneros en guacheras, pues de lo contrario pueden ser transmitidos patógenos como las micobacterias *M.bovis* o *Map* durante la etapa de crianza con alimentación en balde. La leche proveniente de vacas con paratuberculosis debería ser descartada para el uso en la alimentación de los terneros, sin embargo cuando no es posible excluirla o no se han identificado correctamente las vacas infectadas dentro de un rodeo lechero con PTBC, sería recomendable el tratamiento previo con un equipo pasteurizador de eficiencia comprobada para eliminar estos patógenos.

En este estudio nosotros empleamos dos cepas diferentes de *Map* para evidenciar alguna posible sensibilidad mayor al calor de diferentes cepas de micobacterias como se ha sugerido previamente, sin embargo no pudimos comprobar las diferencias en la susceptibilidad al tratamiento térmico de las dos diferentes cepas de *Map* utilizadas debido a que no se recuperaron células viables en leches pasteurizadas. Otros trabajos han demostrado que no existen diferencias entre la susceptibilidad de las cepas al tratamiento térmico con pasteurizadores (McDonald et al, 2005).

La susceptibilidad al tratamiento térmico está asociado a la presencia de *clumps* que forman las células de *Map*, a pesar de que otros estudios han demostrado que no existiría diferencia en la susceptibilidad al calor de células micobacterianas agregadas o no agregadas.

En nuestro trabajo no encontramos diferencias de recuperación de *Map* entre los tratamientos ya sea usando previa decontaminación con HPC o cultivando las muestras pasteurizadas sin decontaminación previa. Debido a que el tiempo de decontaminación utilizado fue medianamente corto (5 hs) probablemente se redujo la posibilidad de que afectara la viabilidad de *Map*. Otros trabajos usando tratamientos con HPC y antibióticos como vancomicina, anfotericina B y ácido nalidixico (VAN) han demostrado que reducen la recuperación de *Map* afectando la supervivencia de *Map*. Cuando es utilizada una decontaminación media o mínima de la muestra no ejerce impacto sobre la muerte de *Map* como ha sido demostrado en otros trabajos (McDonald, 2005).

En estudios de escala comercial con pasteurizadores de 3000L/hora se demostró que la pasteurización redujo desde 4 log hasta 6 log la concentración de *Map* utilizando 72°C por 15 y 78°C por 25 seg. con un protocolo de reducida contaminación (McDonald, 2005).

Si bien en este estudio preliminar no se probó la eliminación de otras micobacterias, sería deseable comprobar la susceptibilidad de las mismas a la pasteurización con tratamientos similares a los probados aquí. Si al menos la susceptibilidad al tratamiento térmico fuese similar a la que demostró *Map* e incluso *M. phlei* en este trabajo, podría asumirse que el uso de este tipo de equipos de pasteurización de la leche bovina destinada al consumo por terneros, podría minimizar los riesgos de transmisión por la vía digestiva y cortar la cadena transmisión de otras enfermedades producidas por otras micobacterias frecuentemente presentes en rodeos lecheros de la Argentina. Para evidenciar esta hipótesis, deberían realizarse otras pruebas con un diseño experimental que contribuya a mejorar el conocimiento de la eliminación de patógenos en la leche.

### **Agradecimientos**

A la Empresa Bossio por ceder el equipo pasteurizador para este estudio.

## Bibliografía

- Ayele, W., Svastova, P., Roubal, P., Bartos, M., Pavlik, I.** *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* cultured from locally and commercially pasteurized cow's milk in the Czech Republic. *Appl Environ Microbiol* 2005; 71 (3): 1210-1214.
- Chiodini, R., van Kruiningen, J., Merkal, S.** 1984. Runinants paratuberculosis (Jhone's disease): de current status and future prospects. *Cornell Vet* , 74: 218-262.
- Chiodini, R., 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.
- 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(11):1872-1876.
- Ellingson, J.; Anderson, J.; Koziczowski, J.; Radcliff, R.; Sloan, S.; Allen ,S.; -Grant, I.; Ball, N.; Neill, S.; Rowe, M.** 1996. Inactivation of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in cow's milk at pasteurization temperatures. *Appl Environ Microbiol.* 62 (2): 631-636.
- Ellingson J, Anderson J, Koziczowski J, Radcliff R, Sloan S, Allen S., et al.** 2005. Detection of viable *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in retail pasteurized whole milk by two culture methods and PCR. *J of Food Prot*; 68 (5): 966-972.

- 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.
- Gonda, M., Chang, Y., Shook, G., Collins, M., Kirkpatrick, B.** 2007. Effect of *Mycobacterium avium* subsp. *Paratuberculosis* infection on production, reproduction, and health traits in US Holsteins. Prev Vet Med, in press. Available online [www.sciencedirect.com](http://www.sciencedirect.com)
- 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 (2): 631-636.
- Grant, I., Ball, H., Rowe, M.** 1997. A novel staining technique for assessing clumping and viability of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* cells during pasteurization. Proceedings of the 5<sup>th</sup> International Colloquium on Paratuberculosis. International Association of Paratuberculosis Inc, Rehoboth, MA, USA. p. 456-458.
- Grant, I.** 1998. Letter to the editor: Does *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* survive current pasteurization conditions? Appl Environ Microbiol. (7): 2760-2761.
- Grant, I., Ball, H., Rowe, M.** 1999. Effect of higher pasteurization temperatures and longer holding times at 72 degrees C on the inactivation of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in milk. Lett Appl Microbiol. 28(6):461-465.
- Grant, I., Hitchings, E., Ball, H., Rowe, M.** 2002a. Impact of commercial HTST pasteurization on *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in naturally infected cow's milk. Appl Environ Microbiol. 68(2): 602-607.

- 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: 2428-2435.
- Grant, I.** 2006. Occurrence of *Mycobacterium avium* subsp *paratuberculosis* in foods and the impact of milk processing on its survival. Proceeding of 8<sup>th</sup> International Colloquium on Paratuberculosis, Copenhagen, Denmark. August 14 – 18, 2005.
- Greenstein, R.** 2003. Is Crohn's disease caused by mycobacterium ? Comparison with leprosy, tuberculosis, and Jhone's diseases. *Lancet Infectious disease*, 3. 507- 514.
- Hasanova, L.; Pavlik, I.** 2006. Economic impact of Paratuberculosis in dairy cattle herds: a review. *Veterinarni Medicine*, 51(5): 193-211.
- Hermon-Taylor, J.** 2000. *Mycobacterium avium* subsp.*paratuberculosis* in the causation of Crohn's disease. *World J Gastroenterol*, 6(5) 630 - 632.
- Hruska, K.; Bartos, M.; Kralik, P.; Pavlik, I.** 2005. *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in powdered infant formula. *Vet Med, Czech*. 50:8.
- McDonald, W.; O'Riley, K.; Schroen, Ch.; Condrón, R.** 2005. Heat inactivation of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in milk. *App Environm Microbiol*, 71(4): 1785 -1789.

- Meylan, M., Rings, D., Shulaw, W., Kowalsky, J., Bech Nielsen, S., Hoffsis, G.** 1996. Survival of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* and preservation of immunoglobulins G in bovine colostrum under experimental conditions simulating pasteurization. Am J Vet Res, 57: 1580 – 1585.
- Millar, D., Ford, J., Withey, S., Tizard, M., Doran, T., Hermon-Taylor, J.** 1996. IS900 PCR to detect *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in retail supplies of whole pasteurized cow's milk in England en Wales. Appl Environ Microbiol. 5(11): 3446-2452.
- Moreira, A., Paolicchi, F., Morsella, C., Zumarraga, M., Cataldi, A., Bigi, F., Alito, A., Overduin, P., 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.
- Naser, S., Schwarz, D., Shafran, I.** 2000. Isolation of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* from breast milk of Crohn's disease patients. Am J Gastroenterol. 95 (4):1094-1095.
- Paolicchi, F., Zumarraga, M.; Gioffre, 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.
- Paolicchi F, Cirone K, Morsella C, Gioffre A, Cataldi A, Romano M.** 2005. Isolation of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* from commercial pasteurized milk. Proceedings of the 8<sup>th</sup> International Colloquium on Paratuberculosis 2005, p. 68, Copenhagen, Denmark.



- Pavlas, M.** 1990. Thermoresistance of Micobacteria. *Acta Veterinaria*, Brno, 59: 65-71.
- Pearce, L., Crawford, R., Troung, H., Yates, G., Lisle, G.** 2002. The recovery of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* following heat treatment of inoculated milk in a turbulent-flow pasteurizer is not adversely affected by decontamination and antibiotic selection. Proceedings of the 7<sup>th</sup> International Colloquium on Paratuberculosis. Bilbao, Portugal; p. 102.
- Stabel, J., Steadham, M., Bolin, C.** 1997. Heat inactivation of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in raw milk: are current pasteurization conditions effective?. *Appl Environm Microbiol*, 63(12): 4975 – 4977.
- Stabel, J.** 2001. On-farm batch pasteurization destroys *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in waste milk. *J Dairy Sci.* 84 (2):524 - 527.
- Stabel, J., Hurd, S., Calvente, L., Rosenbush, R.** 2004. Destruction of *Mycobacterium avium* subsp *paratuberculosis*, *Salmonella spp.*, and *Mycoplasma spp.* in raw milk by a commercial on-farm high-temperature, short-time pasteurizer. *J. Dairy Sci*, 87: 2177-2183.
- Stretter, R., Hoffsis, G.; Beach-Nielsen, S.; Shulaw, W.; Rings, M.** 1995. Isolation of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* from colostrum and milk of subclinically infected cows. *Am J Vet Res*, 56: 1322 – 1324.
- 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 (5): 966-972.

- Sung, N., Collins, M.** 1998. Thermal tolerance of *Mycobacterium avium* subsp. *Paratuberculosis*. Appl Environm Microbiol, 64: 999 – 1005.
  
- Sweeney, R., Whitlock R., Rosenberg, A.** 1992. *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* cultured from milk and supramammary lymph nodes of infected asymptomatic cows. J Clin Microbiol, 30: 166 – 171.
  
- Taylor, T., Wilks, C., McQueen, D.** 1981. Isolation of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* from the milk of a cow with Jhone´s Diseases. Vet Rec, 109: 532 – 533.

**TABLA 1:** Resultados de la pasteurización de leche bovina cruda con un equipo comercial para uso en tambos. Tipos de tratamiento, inóculos usados y resultados de los cultivos realizados en leches crudas pasteurizadas y no pasteurizadas con y sin inoculación experimental de *Map* y de *M. phlei*.

	Tipo de tratamiento	Inoculos (ufc/mL)	Resultado del cultivo
<b>Leches crudas no inoculadas</b>	No Pasteurizada	-	Negativo
	Pasteurizada 72,5°C x 15 seg.	-	Negativo
<b>Leches crudas inoculadas</b>	No Pasteurizada	- <i>Map</i> (2x10 <sup>6</sup> ufc/mL)	Positivo
		- <i>M.phlei</i> (4x10 <sup>4</sup> ufc/mL)	Positivo
	Pasteurizada 72,5°C x 15 seg	- <i>Map</i> (2x10 <sup>6</sup> ufc/mL)	Negativo
		- <i>M.phlei</i> (4x10 <sup>4</sup> ufc/mL)	Negativo
	Pasteurizada 72,5°C x 30 seg	- <i>Map</i> (2x10 <sup>6</sup> ufc/mL)	Negativo
		- <i>M.phlei</i> (4x10 <sup>4</sup> ufc/mL)	Negativo
	Pasteurizada 72,5°C x 60 seg	- <i>Map</i> (2x10 <sup>6</sup> ufc/mL)	Negativo
		- <i>M.phlei</i> (4x10 <sup>4</sup> ufc/mL)	Negativo