

## Valoración microbiológica de la leche de tanque

### Introducción

Al observar los anuncios publicitarios de la televisión y la prensa, podemos comprobar la importancia que tiene para la industria láctea la calidad de los productos y como esta calidad se refleja “desde el origen”.

El recuento celular y las mamitis clínicas, han tenido una gran importancia económica para las empresas ganaderas y esto ha supuesto que hayamos dedicado un gran esfuerzo a estos dos parámetros. La bacteriología sin embargo, frecuentemente se relega a un segundo plano y sólo se hace protagonista al superar el umbral establecido por la industria lo que implica pérdidas económicas directas ya que por encima del límite legal está el límite económico.

Desde “Solomamitis.com” queremos dar una visión distinta de la bacteriología, también parámetro de calidad, abriendo un campo interesante con una amplia repercusión en el estatus de la granja. No debemos olvidar, que como veterinarios, somos el primer vínculo con el origen de la materia prima: la leche.

Para abordar la bacteriología debemos tener previamente, estos 7 conceptos claros:

1. Para actuar no hay que esperar a tener recuentos bacteriológicos elevados. Es una temeridad desde el punto de vista económico y sanitario.
2. De igual forma que conocemos el recuento celular, debemos tener un conocimiento exhaustivo del estatus bacteriológico de la granja.
3. La bacteriología comienza fuera de la sala de ordeño y es un fiel reflejo del estado general de la granja y sus instalaciones.
4. No debemos considerar como único dato bacteriológico el recuento de Aerobios Mesófilos.
5. Los datos bacteriológicos por encima de 50.000 ufc/ml deben pasar primero por un protocolo de actuación general de la granja antes de iniciar una monitorización de las muestras de leche de tanque (SPC, LPC, Coliformes, etc.).
6. La revisión de los sistemas de ordeño debe incorporar también una revisión del sistema de lavado, incluyendo los tanques de frío o isotermos, sistemas de enfriamiento, tanques de balance y circuitos de transporte de la leche. Las revisiones deben tener carácter preventivo e instaurar un mantenimiento. No hay que olvidar que cualquier anomalía ya supone un problema económico o sanitario para la granja.
7. La correcta toma de muestras es de vital importancia para poder tomar una decisión acertada sobre las pautas a realizar en una granja. La regularidad y la higiene deben acompañarnos en todo momento.

Esperamos con este artículo que los veterinarios hablen de la bacteriología con la misma fluidez con la que se habla del recuento celular o los casos de mamitis clínicas.

### Microbiología de la leche

Podemos clasificar o distinguir tres grupos de microorganismos según la temperatura óptima de crecimiento (moderada, baja o elevada respectivamente).

- Mesófilos
- Psicrófilos
- Termófilos

Al grupo de las **Bacterias Mesófilas** pertenece la mayoría de la flora que se encuentra con mayor frecuencia en la leche, principalmente las bacterias lácticas, levaduras y hongos, Enterobacterias, muchas especies de Estreptococos, Estafilococos, Propionibacterias, y numerosas especies del género *Pseudomonas*.

Las **Bacterias Psicrófilas** son las que crecen a temperaturas de refrigeración. A este grupo pertenecen bacterias de los géneros *Pseudomonas*, *Flavobacterium*, *Acinetobacter*, *Alcaligenes* y *Bacillus*.

Las **Bacterias Termófilas** son aquellas que crecen bien a temperaturas entre 45 y 55 °C. A este grupo pertenecen *Lactobacillus bulgaricus*, *L. fermenti*, *L. lactis*, *L. helveticus*, *L. acidophilus*, *Streptococcus thermophilus* y *Bacillus stearothermophilus*.

Otro grupo que merece ser nombrado son las **Bacterias Termodúricas** que son bacterias en su mayoría mesófilas (algunas termófilas) que resisten temperaturas de pasteurización. Se incluyen en este grupo los *Micrococcus*, *Microbacterium* y esporas de *Bacillus* y *Clostridium*.

Los microorganismos **Psicrótrofos** y los **Termótrofos**, son microorganismos mesófilos pero que igualmente pueden crecer a temperaturas bajas o altas, respectivamente.

**Tabla 1 :Rangos de temperatura (°C) para el crecimiento de los diferentes grupos de Microorganismos.**

Grupos de microorganismos	Temperatura mínima (°C)	Temperatura óptima (°C)	Temperatura máxima (°C)
Termófilos	40-45	55-75	60-90
Termótrofos	15-20	30-40	45-50
Mesófilos	5-15	30-40	40-47
Psicrófilos	-5 +5	12-15	15-20
Psicrótrofos	-5 +5	25-30	30-35



**Tabla 2: Microorganismos Psicrófilos y Termodúricos presentes en la leche cruda.**

Generos Termodúricos	Generos Psicrófilos
<i>Microbacterium</i>	<i>Pseudomonas</i>
<i>Micrococcus</i>	<i>Acinetobacter</i>
Esporos de <i>Bacillus</i>	<i>Flavobacterium, Aerobacter</i>
Esporos de <i>Clostridium</i>	<i>Alcaligenes</i>
<i>Alcaligenes</i>	<i>Bacillus, Arthrobacter</i>
<i>Streptococcus</i> spp.	<i>Aeromonas</i>

## Toma de muestra, identificación y envío al laboratorio

Como ya dijimos este apartado es de gran importancia y supone la base de la toma de decisiones. Para no llevarnos a error debemos tener bien claro las siguientes cuestiones.

### Cuándo y cómo recoger la muestra

Se recomienda recoger la muestra de un solo ordeño y tras al menos 1 o 2 horas después de haber ordeñado.

En el momento de la toma de la muestra, la leche del tanque de refrigeración deberá tener 3-4 °C de temperatura y estar homogeneizada por agitación mecánica durante al menos 5 minutos. La muestra deberá ser representativa de la leche del tanque de la explotación.

La cantidad a recoger será de unos 40 o 50 ml y se realizará en condiciones higiénicas (asépticas) y siempre por la parte alta del tanque, nunca de grifos, tubos u otros elementos. De esta forma evitaremos posibles contaminaciones bacterianas.

Por último, la muestra se identificará para su envío al laboratorio con el nombre y/o número de explotación, fecha de recogida y temperatura del tanque.

### Número de muestras a recoger

Como mínimo se recogerá una muestra al mes, aunque lo recomendable son dos muestras mensuales. No obstante, esto se deja a criterio del veterinario que visita la explotación.

### Conservación y transporte de las muestras al laboratorio

Las muestras se conservarán en todo momento a una temperatura de 3-4 °C. No deben congelarse ni tampoco contener un bacteriostático (ej: conservante azidol). El envío debe realizarse en paquetes con hielo.

Las muestras tienen que procesarse antes de las 36 horas de la recogida.

## Parámetros analíticos

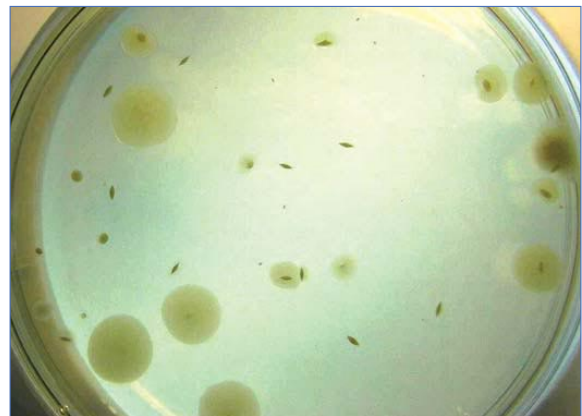
### Recuento de células somáticas (RCS). Método automatizado. Citometría de flujo

En esta técnica el ADN de las células somáticas se tiñen con un colorante fluorescente. Las células teñidas son forzadas a pasar a través de una célula de flujo y excitadas por un rayo láser. La luz emitida es detectada por un microscopio electrónico.

### Recuento de Mesófilos Totales a 30 °C (SPC):

#### Método de referencia: recuento en placa. Norma ISO 4833:2003

Este método está basado en la siembra de inóculos en medio sólido específico, Plate Count Agar (PCA), incubación aeróbica a 30 °C y posterior recuento en placa de una muestra de leche y sus diluciones decimales.



- Equipos y materiales
  - Cabina de flujo laminar.
  - Contador de colonias.
  - Baño termostático regulado a 44-47 °C.
  - Microscopio.
  - Estufa de cultivo regulada a 30 °C ± 1 °C.
  - Lámpara de luz UV.
  - Mechero Bunsen.
  - Agitador de tubos tipo Vortex.
  - Pipetas estériles de 1 y 10 ml.
  - Placas de Petri estériles de 90 mm de diámetro.
- Reactivos / Medios de cultivo
  - Diluyente: agua de peptona tamponada o solución Ringer.
  - Plate Count Agar (PCA) enriquecido con leche desnatada en polvo (1 gramo por 1.000 ml).
  - Agua desionizada.

- Preparación de la muestra y de sus diluciones decimales
  - Preparación de la muestra y de la dilución primaria (10<sup>-1</sup>)  
Con el fin de asegurar un reparto uniforme de los microorganismos, mezclar cuidadosamente la muestra invirtiendo rápidamente 25 veces el recipiente que la contenga. Evitar la formación de espuma o dejar que se disperse.  
Abrir en condiciones asépticas el recipiente que contiene la muestra, tomar 1 ml con una pipeta estéril y transferirlo a un tubo que contenga 9 ml del diluyente estéril. Evitar el contacto entre la pipeta y el diluyente. Homogeneizar con un agitador de tubos durante 5 - 10 segundos para obtener la dilución 10<sup>-1</sup>.
  - Preparación de las diluciones decimales  
Repetir la operación anterior utilizando la dilución 10<sup>-1</sup> para obtener la dilución 10<sup>-2</sup> y así sucesivamente hasta la dilución en la que podamos contar el número de microorganismos presentes. Utilizar por cada dilución una nueva pipeta estéril.
  - Duración de las operaciones  
El tiempo desde que se acaba de preparar las diluciones decimales hasta que el inóculo entre en contacto con el medio de cultivo, no debe de exceder de 15 minutos.
- Realización: siembra en masa
  - Sembrar, por duplicado, 1 ml de leche o 1 ml de sus diluciones decimales en placas de Petri vacías y estériles. Añadir unos 15 ml de medio PCA enriquecido con leche en polvo, fundido y enfriado en un baño de agua a aproximadamente 45 °C. Mezclar con mucho cuidado el inóculo y el medio para obtener una distribución homogénea de los microorganismos (5 movimientos longitudinales seguidos de 5 movimientos circulares en el sentido de las agujas del reloj, 5 movimientos longitudinales perpendiculares a los primeros y 5 movimientos circulares en el sentido contrario a las agujas del reloj).
  - Colocar las placas en una superficie horizontal y limpia, hasta la solidificación del medio.
  - Incubar las placas invertidas, a la temperatura de 30 °C durante 72 horas ± 3 horas.
- Recuento de colonias y expresión de resultados  
Utilizar los recuentos de las placas que contengan entre 10 y 300 colonias.  
Se calcula el número 'N' de microorganismos por mililitro de muestra según la fórmula:

$$N = \frac{Z C}{V (n_1 + 0,1 n_2) d}$$

Donde:

ZC = sumatorio de colonias contadas en todas las placas seleccionadas.

V = volumen inoculado en mililitros.

n<sub>1</sub> = número de placas contadas de la primera dilución.

n<sub>2</sub> = número de placas contadas de la segunda dilución.

d = factor de dilución correspondiente a la primera dilución.

Los resultados deben de redondearse a dos cifras significativas.

El resultado se dará como unidades formadoras de colonias por mililitro de producto, expresado en un número comprendido entre 1,0 y 9,9 multiplicado por 10<sup>x</sup>, donde x es la potencia apropiada de 10.

#### Método automatizado. Citometría de flujo: Bactoscan FC

Se basa en el conteo del número total de recuentos de impulsos. En esta técnica las bacterias se tiñen con un colorante fluorescente, y los componentes de la leche que pueden interferir, como las células somáticas, son eliminados por tratamiento químico. Las bacterias teñidas son excitadas por un rayo láser y la luz emitida se detecta por un detector de fluorescencia cuando una fina corriente de muestras pasa a través de una célula de flujo.

Los impulsos luminosos son transformados en impulsos electrónicos y contados cuando superan un cierto nivel dando lugar a un "recuento de impulsos Bactoscan".

La utilización de esta técnica implica la obtención de una tabla de conversión de impulsos Bactoscan a unidades formadoras de colonias de acuerdo con el método de referencia. (Norma ISO 21187: Tabla de conversión de Impulsos Bactoscan – Recuento en placa de mesófilos a 30 °C).

Al realizar el recuento de microorganismos Mesófilos Totales a 30 °C estimamos el número total de gérmenes, sin especificar el tipo.

El límite legal de microorganismos (ufc/ml a 30 °C) permitidos en la leche cruda de vaca destinada a la producción de leche tratada térmicamente, fermentada, cuajada, coagulada y productos lácteos es de: < 100.000 ufc/ml<sup>a</sup>

<sup>a</sup> media geométrica observada durante un periodo de dos meses, con dos muestras, por lo menos al mes.

#### Recuento de Mesófilos Totales a 30 °C después de la preincubación de la muestra (PIC):

Consiste en realizar el recuento de Mesófilos Totales (véase "Método de referencia: recuento en placa") después de incubar la muestra de leche a 12,8 °C (55 °F) durante 18 horas.

De esta forma aceleramos el crecimiento de aquellos microorganismos que normalmente no crecen a temperaturas de refrigeración y que son los responsables de malos olores, vida corta de la leche, etc.



**Recuento de Mesófilos Totales a 30 °C después de la pasteurización (LPC):**

Consiste en realizar el recuento de Mesófilos Totales (véase “Método de referencia: recuento en placa”) después de pasteurizar la muestra de leche a 62,8 °C (143 °F) durante 30 minutos.

Las bacterias que sobreviven la pasteurización son las llamadas termorresistentes o termodúricas.

**Recuento de microorganismos**

**Recuento de microorganismos lactosa positivos y de microorganismos lactosa negativos (medio McConkey).**

- Microorganismos lactosa positivos: Coliformes totales (CC):  
*E.coli*; *Klebsiella* spp.; *Enterobacter* spp.; *Citrobacter* spp.
- Microorganismos lactosa negativos: No Coliformes:  
*Pseudomonas* spp.; *Serratia* spp; *Proteus* spp.

**Recuento de Estafilococos coagulasa positivos y Estafilococos coagulasa negativos (SCN) (medio Baird Parker más Rabbit Plasma Fibrinogen).**

- Estafilococos coagulasa positivos: *Staphylococcus aureus*.
- Estafilococos coagulasa negativos (SCN): Otros Estafilococos.

**Recuento de Estreptococos esculina negativo y Estreptococos esculina positivo (medio Edward’s más sangre).**

- Esculina negativos: *Streptococcus agalactiae*.
- Esculina positivo: Otros Estreptococos.

Se realiza una siembra en superficie de la muestra de leche de tanque en cuatro medios selectivos: Baird Parker más Rabbit Plasma Fibrinogen, Edwards, McConkey y CGA, para su identificación y posterior recuento.

- Equipos y materiales
  - Cabina de flujo laminar.
  - Contador de colonias.
  - Baño termostático regulado a 44-47 °C.
  - Placas de Petri estériles de 90 mm de diámetro.
  - Microscopio.
  - Estufa de cultivo regulada a 37 °C ± 1 °C.
  - Lámpara de luz UV.
  - Mechero Bunsen.
  - Agitador de tubos tipo Vortex.
  - Cronómetro.
  - Portaobjetos.
  - Asa de siembra.
  - Asa calibrada de 10 µl.
  - Pipetas Pasteur.

• Reactivos/ Medios de cultivo

Reactivos

- Peróxido de hidrógeno al 3%.
- Slidex (R) Strepto B.
- Agua desionizada.

Placas de Petri de los medios de cultivo:

- Agar Sangre Esculina (TSB).
- Baird Parker (BP) más Rabbit Plasma Fibrinogen (RPF).
- Edward’s mas sangre.
- McConkey.
- CGA.

• Preparación de la muestra

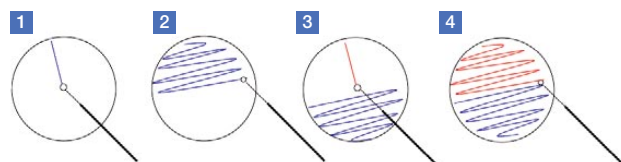
Con el fin de asegurar un reparto uniforme de los microorganismos, mezclar cuidadosamente la muestra invirtiendo rápidamente 25 veces el recipiente que la contenga. Evitar la formación de espuma o dejar que se disperse.

• Realización: siembra en superficie

Abrir en condiciones asépticas el recipiente que contiene la muestra e introducir un asa calibrada. Sembrar 10 ml en superficie en la mitad de la placa y 10 ml en la otra mitad, de manera que sembraremos un total de 20 ml, en los siguientes medios:

- Baird Parker más Rabbit Plasma Fibrinogen.
- Edward’s más sangre.
- McConkey.
- CGA.

A continuación, observamos la secuencia de la siembra.



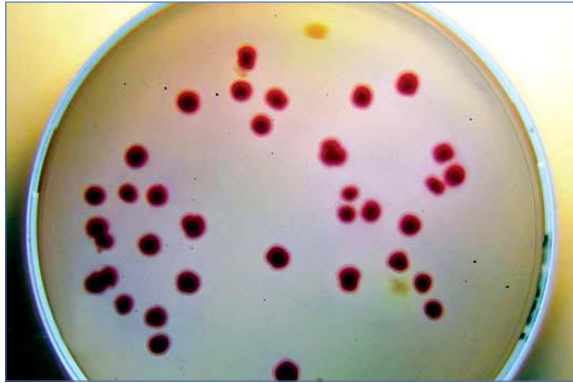
Incubar las placas a 37 °C durante 24-48 horas. Realizar un recuento inicial a las 24 horas y el recuento definitivo a las 48 horas. Si en las placas de CGA a las 48 horas no ha crecido nada, dejarlas incubar más días a 25 °C.

• Identificación y recuento

• Placas de McConkey. Recuento de Coliformes Totales (CC) y No Coliformes (NC)

Se considera flora colibacilar (Coliformes totales) todas aquellas colonias que aparezcan en el medio con una coloración roja debido a la fermentación de la lactosa (lactosa positivos). Las colonias incoloras se considerarán lactosa negativos (No coliformes).



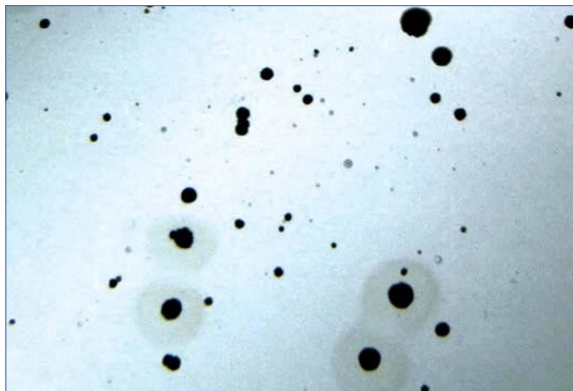


- Placas de Baird Parker (BP) más Rabbit Plasma Fibrinogen (RPF). Recuento de Estafilocos coagulasa positivos: *S. aureus* y Estafilocos coagulasa negativos (SCN)

El medio de cultivo BP más RPF contiene la prueba de la coagulasa en la misma placa.

La identificación y el recuento de *Staphylococcus aureus* será directa en la placa contando las colonias que presenten un halo opaco y blanquizco alrededor de la colonia de color negro.

El resto de colonias sin halo se consideran Estafilocos coagulasa negativos.

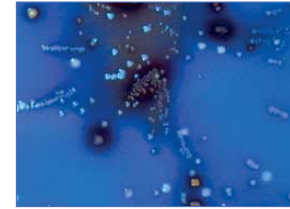
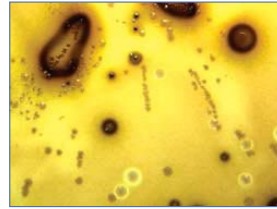


- Placas de Edward's más sangre. Recuento de *Streptococcus agalactiae* y otros Estreptococos (SSLO).

El medio de cultivo nos permite diferenciar las colonias esculina positivas (+) de las colonias esculina negativas (-).

*Streptococcus agalactiae* es esculina (-) y €/-hemolítico o no hemolítico. Para diferenciar mejor las colonias, podemos mirar la placa iluminada con luz ultravioleta. Las colonias de *Streptococcus agalactiae* aparecen de color azul claro.

Las colonias esculina (+) las clasificaremos como "Otros Estreptococos".



A continuación tras la primera aproximación, picar una colonia esculina (-) y realizar la prueba de la catalasa. Si es catalasa (-), realizar la prueba de CAMP. Si resulta positiva, realizar la prueba de aglutinación. Si existe aglutinación, entonces nos encontramos ante *Streptococcus agalactiae*.

- Pruebas bioquímicas

#### Prueba de la catalasa

FUNDAMENTO. Los microorganismos que poseen el enzima catalasa liberan agua y oxígeno a partir de peróxido de hidrogeno.

PROCEDIMIENTO. Colocar una gota de peróxido de hidrogeno encima de una placa de Petri vacía y mojar la colonia sospechosa con un asa de siembra.

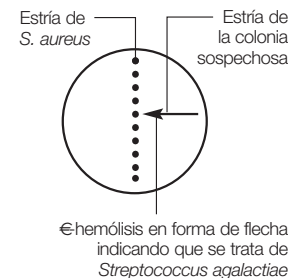
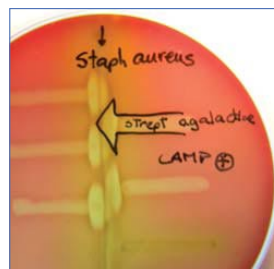
INTERPRETACIÓN DEL RESULTADO. Es catalasa positiva cuando hay formación de burbujas. En caso contrario es catalasa negativa.

#### Prueba de CAMP

FUNDAMENTO. Diferencia *Streptococcus agalactiae* de otros Estreptococos esculina negativos.

PROCEDIMIENTO. Sembrar una estria recta de una cepa de *Staphylococcus aureus* longitudinalmente en el centro de una placa de Agar Sangre Esculina. Perpendicular a ella, los aislamientos objeto de estudio (las colonias sospechosas) y un control positivo. Incubar a 37 °C durante 24 horas.

INTERPRETACIÓN DEL RESULTADO. La reacción es positiva cuando se produce una zona de €hemólisis en forma de punta de flecha.



#### Prueba de aglutinación.

FUNDAMENTO. Los Estreptococos €hemolíticos generalmente, tienen antígenos específicos de grupo, que pueden ser extraídos e identificados con antisueros.



**PROCEDIMIENTO.** Después del cultivo, tomar las colonias aisladas de *Streptococcus* €hemolíticos y depositarlas en un tubo de extracción. El antígeno específico de grupo es extraído enzimáticamente e identificado por partículas de látex sensibilizadas por un anticuerpo anti-antígeno de grupo de *Streptococcus*.

**INTERPRETACIÓN DEL RESULTADO.** Si el antígeno está ausente, el reactivo látex permanece en suspensión homogénea.

• **Placas de CGA. Presencia o ausencia de *Prototheca*.**

El medio de cultivo permite el crecimiento de las colonias de *Prototheca* que se identificarán por sus elementos morfológicos típicos como esporangios de dimensiones grandes (10-30 mm) que contienen de 4 a 8 células de la hija.

Para su mejor identificación morfológica podemos hacer una tinción con azul algodón lactofenol.



• **Recuento de colonias y expresión de resultados**

Para conocer el número de colonias en total, hay que realizar el recuento de las colonias características y multiplicar por el factor de dilución:

$$\text{ufc/ml} = N \times F$$

Siendo,

N = número de colonias características.

F = factor de dilución.

F = 50, cuando el volumen de siembra es de 20 µl.

F = 100, cuando el volumen de siembra es de 10 µl.

**Investigación de *Prototheca***

Véase "Recuento de microorganismos lactosa positivos y de microorganismos lactosa negativos". Cloranfenicol Glucosa Agar (CGA).

**Investigación de *Mycoplasma***

Para realizar el aislamiento de *Mycoplasmas*, sembraremos en medio de cultivo para el crecimiento de los organismos *Pleuropneumoniae like organism* (PPLO) y visualizaremos al microscopio las colonias típicas. Se usa una variante del medio de Hayflick. La técnica es la siguiente:

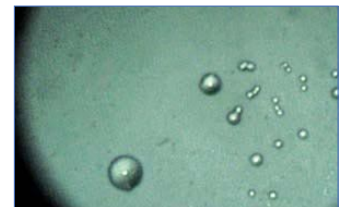
Se inoculan 100 ml de leche en una placa de agar. Se incuba a 37 °C en una atmósfera de CO<sub>2</sub> al 10% y con 90% de humedad. Para el medio en placa se usan dos bases:

- 18 g del *Mycoplasma* Agar Base en 500 ml de agua destilada.
- 11 g de Caldo PPLO sin cristal violeta, 10 g Agar N° 1 en 500 ml de agua destilada.

Estas 2 bases se disuelven en un erlenmeyer de 1.000 ml, se esterilizan al autoclave a 121 °C y se le agregan calentados a 37 °C los siguientes componentes:

- 110 ml de suero de caballo.
- 70 ml de una solución de extracto fresco de levadura al 25%.
- 14 ml de una solución de acetato de talio al 1% (peso/volumen).
- 10 ml de una solución de ADN al 0,2% (p/v).
- 4 ml de penicilina (200.000 UI/ml).
- 10 ml de una solución de dextrosa al 50% (p/v).

En este medio descrito se siembran 100 µl de leche y se incuban en una atmósfera de CO<sub>2</sub> durante 3 días, momento de la primera lectura al microscopio. Transcurridos 7 días, se vuelve a mirar al microscopio. Es necesario mirar todo el campo de siembra y ver las colonias típicas en forma de huevo frito.



**Residuos de inhibidores de crecimiento (*Eclipse 100*)**

Este análisis se realiza para asegurarnos de que la leche de tanque no contiene ningún tipo de inhibidor que pudiera falsear los resultados analíticos mencionados.

Se trata de un test microbiológico de difusión que se basa en añadir una muestra de leche a un medio de cultivo (agar) con una cantidad estandarizada de esporas o formas vegetativas de *Bacillus stearothermophilus* (microorganismo control), nutrientes y un indicador de pH (indicador ácido-base).

Tras un periodo de difusión se incuba a temperatura óptima hasta conseguir el crecimiento normal con la consiguiente producción de ácido por la bacteria. Esto causa un viraje en el color del indicador. Si existen sustancias inhibidoras en la muestra de leche, se impedirá la multiplicación del microorganismo control y la consecuente producción de ácido y el color del indicador permanecerá invariable.



La lectura de los resultados puede realizarse visual o fotométricamente. En el primer caso, se observa el color de los pocillos. Si estos presentan un color violeta-azulado se consideran positivos y si por el contrario presentan un color amarillento se interpretan como negativos. Para la lectura fotométrica, medimos la absorbancia a 590 y a 650 nm. El resultado es la diferencia entre las dos medidas.

La lectura fotométrica permite a los laboratorios establecer los resultados de forma objetiva y sistemática, evitando de esta forma las variaciones debidas a la evaluación visual de diferentes personas. Además, los datos obtenidos por el fotómetro pueden ser perfectamente integrados en el sistema informático del laboratorio con lo que se asegura la perfecta trazabilidad de los resultados.

Para un correcto control del test se aconseja utilizar una muestra como control positivo y otra como control negativo.

Este análisis se realizará para asegurarnos de que la leche de tanque no contiene ningún tipo de inhibidor que pudiera falsear los resultados analíticos mencionados.

### Interpretación de los resultados de un cultivo microbiológico de la leche del tanque

Dentro de la complejidad del control de la calidad de la leche en las explotaciones, hay una parte muy importante que consiste en valorar la evolución del programa implantado en cada granja.

El incremento tanto del recuento celular como del recuento bacteriano, se relaciona con muchos factores potenciales de riesgo. Todos ellos están correlacionados, y debemos saber descifrarlos en cada momento. Así un incremento en la incidencia de mamitis clínicas puede ser causado por gérmenes ambientales o contagiosos. Estos gérmenes a su vez, pueden contaminar la ubre por un fallo de la limpieza de los pezones, fallo en la limpieza del medio ambiente, falta de higiene en el sistema de ordeño o por la entrada de animales foráneos con las ubres infectadas.

Por esta razón es muy importante, poder monitorizar la situación en la que se encuentra cada granja en cuanto a calidad de leche. Esto debe realizarse de manera rápida sencilla y económica, consiguiendo la máxima información posible.



Para monitorizar la salud de la ubre, tenemos muchas herramientas que podemos utilizar. Una de ellas es el cultivo microbiológico, que es un excelente arma, aunque no la única, para controlar la evolución de la explotación y orientar la causa del problema.

Para poder valorar las tendencias de los resultados, debe usarse de forma sistemática. No debemos establecer niveles de actuación con sólo un resultado positivo, pero sí analizar la situación desencadenada en cada momento.

Los sistemas de vigilancia, en cultivo de leche de tanque, son más efectivos cuando los muestreos se realizan con regularidad (Britten, 1996).

Hemos de ser conscientes que los cultivos microbiológicos de leche de tanque para valorar la presencia de gérmenes que pueden ser causa de mamitis, tienen la limitación de dar muchos falsos negativos. Esta sensibilidad relativa al compararla con el cultivo de muestras compuestas de todas las vacas de la explotación, fue de un 21% para *Streptococcus agalactiae*, un 9% para *Staphylococcus aureus*, un 45% para los *Streptococos* ambientales y un 37% para los Coliformes.

De cualquier forma, la sensibilidad de los cultivos de leche de tanque, aunque necesita mejorar, es lo suficientemente correcta para considerarlo como un sistema de vigilancia de la calidad de la leche en una explotación. Sobre todo en el plan de control de *Staphylococcus aureus*.

También es básico monitorizar el manejo previo al ordeño, el ordeño previamente dicho, el lavado del sistema y el entorno de los animales para valorar y realizar un seguimiento de un programa de control de calidad de leche. Pero, ¿cuál sería la forma correcta de monitorizar objetivamente el manejo en la sala de ordeño? Parte de la respuesta también podemos encontrarla realizando un cultivo microbiológico en la leche del tanque.

Los principales parámetros que se analizan en los laboratorios especializados, no sirven para explotaciones con graves problemas en la calidad bacteriológica de la leche. En estas situaciones todos los parámetros se encuentran alterados y ello nos puede conducir a errores fácilmente. Estos parámetros son más significativos en explotaciones con bajos recuentos bacterianos siendo



ideal su utilización en aquellas explotaciones con menos de 50.000 ufc/ml.

Resumimos a continuación algunos de los parámetros que podemos obtener a través de un cultivo de leche de tanque:

- **SPC. Recuento de gérmenes mesófilos totales.**  
La Legislación Europea obliga a producir leche con menos de 100.000 ufc/ml y aunque el nivel óptimo sería el establecido por la norma, consideramos que se debería actuar cuando el recuento sea superior a las 25.000 ufc/ml.

Los parámetros que le afectan son: la falta de limpieza del tanque y circuito de leche, mal funcionamiento del tanque refrigerador, mala preparación de ubres y la incidencia de mamitis.
- **PIC. Recuento de gérmenes mesófilos totales después de una pre incubación de la muestra.**  
Con esta práctica se intenta valorar la existencia de aquellos gérmenes que no tienen capacidad de afectar a la calidad de la leche en fresco.

Como nivel óptimo se establece un recuento inferior a 10.000 ufc/ml y como nivel de acción un recuento por encima de 50.000 ufc/ml.

La presencia de estos gérmenes nos hace pensar en la existencia de una mala preparación de la ubre y un manejo poco higiénico.
- **LPC. Recuento de gérmenes mesófilos totales después de la pasteurización.**  
Con este procedimiento eliminamos los gérmenes sensibles a la temperatura de pasteurización de la leche. Únicamente sobreviven las bacterias termorresistentes a las que no les afecta ni la temperatura ni los productos de limpieza utilizados. Entre ellos también encontramos algunos gérmenes causantes de mamitis (*Bacillus*, *Prototheca*, etc).

Establecemos el nivel óptimo en menos de 100 ufc/ml y el nivel de acción en más de 200 ufc/ml.

Si el resultado se encuentra entre 100 y 500 ufc/ml se considera que el problema es una falta de higiene en la preparación de las ubres de las vacas. Niveles superiores a las 500 ufc/ml suponen un problema de incubación de gérmenes en el sistema de ordeño o en el tanque refrigerador.
- **Recuento de Coliformes totales.**  
Indicador de una falta de higiene en la rutina de ordeño en general y en particular de la preparación de la ubre. También está relacionado con la falta de limpieza de las vacas en el momento del ordeño y es un indicador del estado ambiental de la zona de cama de las vacas de leche. El nivel óptimo se establece en menos de 100 ufc/ml.

Con la combinación de los resultados de LPC y del recuento de coliformes podemos aproximarnos al origen del problema. Si ambos resultados son moderadamente elevados tendremos un problema de una mala higiene en la preparación de la ubre. Si ambos parámetros

son muy altos, el origen está en la incubación de gérmenes por un retraso o falta de enfriamiento de la leche después del ordeño.

		Recuento de coliformes	
		Bajo	Alto
LPC	Bajo	Ningún problema	Higiene del pezón/ ambiente
	Alto	Higiene de la máquina	Higiene del pezón/ higiene de la máquina/ incubación

- **Recuento de Coliformes lactosa negativos.**  
Es un indicador de falta de higiene en general, ya sea en la preparación de las ubres como en la limpieza del circuito de ordeño y tanque refrigerador. Si sólo se encuentra elevado este recuento y no el de coliformes totales, lo interpretamos como una incorrecta limpieza y desinfección mayoritariamente del tanque refrigerador, o del circuito de ordeño donde existen puntos críticos de limpieza. El nivel óptimo se establece en menos de 50 ufc/ml.
- **Recuento de *Streptococcus agalactiae*.**  
Es un indicador específico de la existencia de este germen en la leche del tanque. Podemos detectar una vaca positiva entre 200 vacas en ordeño. El contaje no nos orienta sobre el porcentaje de vacas afectadas. Un alto recuento de *S. agalactiae* puede ir acompañado de un alto SPC. El nivel óptimo se establece en menos de 50 ufc/ml.
- **Recuento de *Staphylococcus aureus*.**  
Se trata, al igual que en el caso anterior, de un indicador específico de la existencia de este germen. Tiene un valor relativo de la existencia de vacas infectadas en la explotación. Para mejorar su significación, habría que tomar muestras de leche diariamente durante cinco días y cultivar una mezcla de las muestras. El objetivo es compensar la excreción discontinua de las vacas afectadas. El nivel óptimo al igual que en el caso anterior se establece en menos de 50 ufc/ml.
- **Recuento de Estafilococos coagulasa negativos.**  
Es un indicador de la flora bacteriana presente en la superficie del pezón. Normalmente se utiliza como un indicador del fallo desinfectante del baño de los pezones después del ordeño. Nivel óptimo menos de 300 ufc/ml.
- **Recuento de *Prototheca*.**  
Indica un tipo de germen específico, resistente a cualquier proceso térmico y relacionado con la salud de la ubre. Es indicador de vacas infectadas de forma crónica. Su existencia nos determina el uso y abuso de tratamientos intramamarios de forma poco higiénica. Según el número de animales infectados y la severidad de la infección, nos puede incrementar el SPC. El nivel óptimo está en menos de 50 ufc/ml. Es una problemática en aumento en las explotaciones al mejorar la salud general de ubre de los animales.





- Recuento de *Streptococcus* spp. no *agalactiae*.  
Relacionado con la falta de higiene de las vacas, especialmente con la calidad del material usado para la cama de las mismas. Los altos niveles también se puede relacionar con animales con mamitis que excretan gran cantidad de estos gérmenes. Es el parámetro más general de todos los citados y por tanto, es el último recuento que disminuye en la mejora del manejo en una explotación. Unos niveles bajos indican un buen entorno medioambiental de la vaca y una muy buena higiene del ordeño. El nivel óptimo es un recuento inferior a 700 ufc/ml.
- Recuento de *Mycoplasma* spp.  
Indicador de la existencia de vacas infectadas en la explotación. Podemos detectar una vaca positiva sobre 1.000 vacas en ordeño. El nivel óptimo es la ausencia total de *Mycoplasma* en la explotación. La entrada del germen se relaciona siempre con la adquisición de animales infectados.

**Toma de decisiones**

Para enfocar el problema y comenzar con la toma de decisiones es muy útil la utilización del siguiente árbol de decisión.

