

# DETECCIÓN DE *MYCOBACTERIUM AVIUM* SUBSP. *PARATUBERCULOSIS* EN LECHE DE CABRAS POR PCR EN MÉXICO

Favila-Humara L.<sup>1</sup>, Hernández-Castro R.<sup>2</sup>, Chávez-Gris G.<sup>1</sup>. 2007. Vº Congreso de Especialistas en Pequeños Rumiantes y Camélidos Sudamericanos, Mendoza, Argentina

1-Departamento de Patología de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia.

2-Depto. de Microbiología e Inmunología de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia.

Universidad Nacional Autónoma de México. México DF, Coyacán, 04510.

[gris@servidor.unam.mx](mailto:gris@servidor.unam.mx) - Tel 525556225888.

[www.produccion-animal.com.ar](http://www.produccion-animal.com.ar)

Volver a: [Enfermedades de los caprinos](#)

## RESUMEN

El presente estudio destaca la utilidad de la PCR para el diagnóstico oportuno de Map a través de la leche de caprinos e incluso la utilidad de la PCR de tipo específico que puede dar datos de posibles fuentes de infección. Por otra parte, se sugiere que a través de este procedimiento se puede identificar a los animales eliminadores de esta micobacteria y así tomar las medidas necesarias para disminuir los riesgos de infección a otros animales y eventualmente para los humanos.

## INTRODUCCIÓN

La paratuberculosis o enfermedad de Johne es un proceso de curso crónico que afecta a los rumiantes y que provoca diarrea profusa en las fases finales de la enfermedad. Su agente causal es el *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (Map), esta bacteria es resistente a una gran cantidad de antibióticos, por lo cual no existe tratamiento en esta enfermedad y además es resistente a algunos procesos de pasteurización. Esta es una enfermedad que se encuentra ampliamente distribuida en todo el mundo y su relevancia radica en el impacto económico asociado a desechos prematuros y sobretodo por las pérdidas económicas que genera. Otro aspecto adicional es la posible implicación en salud pública al asociarse a la Enfermedad de Crohn en los humanos. El diagnóstico de la paratuberculosis ha sido considerado como un proceso complicado, ya que para su aislamiento se requiere tiempo que puede ir desde las 16 semanas y hasta un año para lograr su aislamiento, es por ello que en la práctica se emplean otros métodos para su diagnóstico como las pruebas serológicas y anatomopatológicas, así como pruebas moleculares como la PCR (reacción en cadena de la polimerasa). Es en este sentido que la eliminación de esta bacteria a través de la leche es una manera de transmisión del agente por parte de la madre a las crías y eventualmente ser un riesgo potencial para la enfermedad de Crohn en los humanos.

## MATERIAL Y MÉTODO

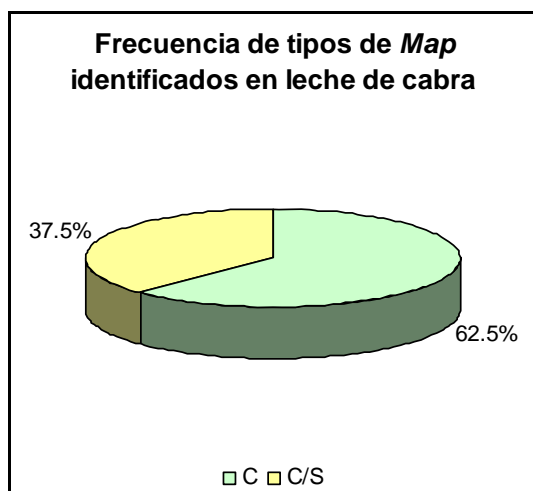
Se tomaron muestras de leche procedentes de rebaños caprinos de los estados de Querétaro y Morelos en donde existían antecedentes clínicos y serológicos de paratuberculosis. Se obtuvo 50 ml de leche de ambos pezones de las cabras, empleando tubos nuevos y estériles tipo Falcon de 50 ml. En todos los casos, las muestras fueron obtenidas por el ordeñador luego del procedimiento de limpieza y desinfección de la ubre que rutinariamente se realiza en la explotación. Adicionalmente, se recolectaron 50 ml de leche no pasteurizada directamente del bote de almacenamiento. Todas las muestras fueron transportadas bajo temperaturas de refrigeración y se procesaron en las primeras 24 horas después de ser obtenidas.

**Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).** Se utilizaron los iniciadores IS900P3N (5'-GGG TGT GGC GTT TTC CTT CG-3') e IS900P5N (5'-ATTTCCGCCGCCACCGCCACG-3'). El protocolo del termociclador consistió en 1 ciclo inicial de desnaturalización a 94° C por 5 min, 35 ciclos de desnaturalización a 94°C por 40 s, alineamiento a 68° C por 40 s, extensión a 72° C por 40 s y finalmente un ciclo de 72° C por 5 min. Posteriormente, se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 2% con TAE y 5 ml de bromuro de etidio. El producto esperado tiene un peso molecular de 314 pb

**PCR tipo específico.** Todas aquellas muestras de ADN que resultaron PCR positivas, fueron sometidas a una nueva PCR para identificar el tipo de cepa de Map al que corresponden. Se utilizaron los iniciadores: DMC529, DMC531 y DMC533. El protocolo consistió en 1 ciclo inicial de desnaturalización a 95° C por 3 min, 25 ciclos a 60° C por 30 s y 94° C por 30s; 1 ciclo a 72° C por 7 min. Posteriormente, se llevó a cabo una electroforesis en gel de agarosa al 2% con 3 ml de bromuro de etidio. En las cepas del tipo C el producto esperado es de 310 pb, mientras que en el tipo S e I el producto es de 162 pb.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La prueba de PCR permitió identificar esta micobacteria a partir del ADN extraído de las muestras de leche pertenecientes a 8 cabras identificadas previamente como seropositivas a paratuberculosis y determinar que 4/8 (50%) de las muestras presentaban cepas de *Map* del tipo “C”, 1/8 (12.5%) cepas del tipo “S” y 3/8 (37.5%). En la mayoría de las muestras de leche de cabra (57.14%), se identificaron por medio de PCR tipo específico cepas de *Map* del tipo “C”, lo que concuerda con los resultados de Chávez GG *et al* quienes identificaron el tipo C1 en 2 cabras de México (Chávez GG *et al* en 2004) así como con lo descrito por Estévez DI *et al*, quienes mencionan que el tipo C1 es el más común en caprinos de México. Recientemente se ha descrito que el tipo C1 es también el tipo más común en bovinos y caprinos de Noruega y cepas de este tipo han sido descritas en aislamientos a partir de caprinos en Australia. Este trabajo sugiere que el papel de la leche en la transmisión de *Map* a otros animales así como a los humanos debe ser considerada.

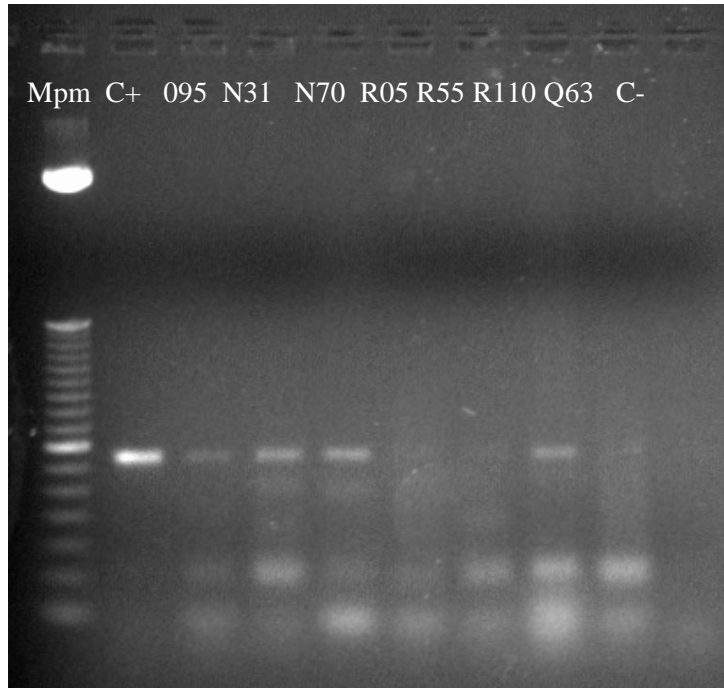


Muestras de cabras Morelos	
Identificación	Resultado PCR DMC
095	S
848	C/S
N31	C
N70	C
R05	C
R55	C
R110	C/S
Q63	C/S

Gel de agarosa al 2% teñido con bromuro de etidio. PCR IS900.

Segundo muestreo Granja Yapa	
Identificación	Resultado PCR IS900
095	-
848	+
N31	+
N70	+
R05	+
R55	+
R110	+
Q63	+

Gel de agarosa al 2% teñido con bromuro de etidio. PCR IS900.



#### BIBLIOGRAFÍA

- Chávez Gris Gilberto, Francisco J. Trigo Tavera, Petra Svastova, Ivo Pavlik. Identificación del polimorfismo genético de aislamientos de *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* de caprinos del centro de México. 2004 Vet Mex 35:75-84.
- Chiodini R. 1989. Cohn's disease and the micobacteriosis: a review and comparison of two disease entities. Clin microbial Rev 2, 90-117
- Estévez-Denaives, R. Hernández-Castro, A. M. Trujillo-García, G. Chávez-Gris. Detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in goat and sheep flocks in Mexico. Small Ruminant Research. In press
- Grant I, Pope C., O'Riordan L., Ball H., Rowe M. 2000. Improvement detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in milk by immunomagnetic PCR. Vet microbial 77:369-378.

Volver a: [Enfermedades de los caprinos](#)