

## Reacción en cadena de la polimerasa como alternativa diagnóstica para *Brucella abortus*, *Leptospira* spp., *Mycobacterium bovis* Y *Mycobacterium paratuberculosis*

**Bolivar, A.M.**

Postgrado Biotecnología de Microorganismos - IOMI-.  
Universidad de los Andes, Facultad de Ciencias,  
Departamento de Biología, Mérida-Venezuela  
[ambolivar@hotmail.com](mailto:ambolivar@hotmail.com)

---

### RESUMEN

En la detección de algunos de los principales agentes infecciosos que atacan al ganado bovino, tradicionalmente y con mayor frecuencia, han sido empleados métodos parasitológicos directos y métodos serológicos. Muchas veces estos métodos han sido cuestionados dadas sus bajas especificidad y sensibilidad, adicional del tiempo consumido en la realización de los mismos. Por estas razones se expone en la presente revisión, la alternativa diagnóstica PCR como sistema de detección altamente sensible, específico y confiable, con ahorros adicionales de tiempo y recursos.

**Palabras claves:** diagnóstico, *B. abortus*, *Leptospira* spp., *M. tuberculosis*, *M. paratuberculosis*, PCR

---

### SUMMARY

In the detection of some major infectious agents that attack cattle, traditionally and more frequently have been employed methods direct parasitological and serological methods. Often these methods have been disputed because of its low specificity and sensitivity, additional time spent in performing them. For these reasons exposed in this review, the alternative diagnostic PCR as a detection system highly sensitive, specific and reliable, with additional savings of time and resources.

**Keys words:** diagnostic, *B. abortus*, *Leptospira* spp., *M. tuberculosis*, *M. paratuberculosis*, PCR

## INTRODUCCION

En las regiones tropicales del mundo en general, y de Venezuela en particular, a raíz de la continua movilización de ganado carentes en parte de un control sanitario adecuado y riguroso, se propicia la aparición dentro de los rebaños de varios agentes infecciosos entre los que se destacan las bacterias causantes de brucelosis, leptospirosis, tuberculosis y paratuberculosis bovinas, todas responsables de cuantiosas pérdidas económicas debido a sus efectos de morbi-mortalidad en las diferentes unidades de producción ganadera (Márquez-Quivera, 2000), sin dejar de mencionar el peligro de contagio al humano que algunas de estas enfermedades presentan (D`Pool y Díaz, 2005).

Tomando en cuenta estas consideraciones, importante es establecer programas específicos de prevención y control, capaces de preservar la salud del rebaño con el menor riesgo de contraer infecciones que conlleven a la aparición de enfermedades y/o muertes (Arias, 2003) requiriéndose para ello, de una sistemática planificación tomando como base el conocimiento epizootológico de cada agente en particular y de las características ecológicas existentes en la región ganadera de interés (Márquez-Quivera, 2000). No obstante esta realidad, la detección de tales infecciones al presente, se basa fundamentalmente en criterios clínicos y métodos de diagnósticos clásicos cuyas fallas principales son bajas en la sensibilidad y especificidad, hechos que dificultan tener idea cierta de la prevalencia e incidencia reales de las dolencias ocasionadas en los rebaños (Rey, 2004; Añez y col., 2007). Lo anterior pareciera justificar la necesidad de llevar a cabo estudios científicos de relevancia que permitan el desarrollo de investigaciones cuyo producto coadyuve al control de las infecciones referidas. Uno de los aspectos indispensables para cumplir con este objetivo, es obtener un diagnóstico certero y efectivo que supere la baja sensibilidad y especificidad de los métodos convencionales empleados hasta el presente (García y Mendoza-León, 2000), hecho que se logra en gran parte, mediante el desarrollo de investigaciones que emplean herramientas moleculares, que en adición a pruebas que permiten evaluar la condición clínica del animal, proporcionan un diagnóstico integral y ayudan en la implementación de medidas específicas, adecuadas y programadas (Medellín-Ledezma, 2002).

Justificado por lo anteriormente expuesto, resulta imprescindible sensibilizar sobre las problemáticas que éstos agentes representan, coordinando políticas de investigación, motor para el diagnóstico y en consecuencia prevención y control de las infecciones señaladas a las que pudiera dársele soluciones por la vía de la investigación científica, trabajando sobre una problemática real que se vive a diario en las explotaciones ganaderas donde *B. abortus*, *Leptospira* spp., *M. bovis* y *M. paratuberculosis* pudieran constituir factores que interfirieran sobre el desarrollo ganadero, pretendiendo con la introducción de técnicas

biotecnológicas, poner a la disposición del productor de herramientas científicas lo suficientemente sólidas como para responder a tales retos.

En respuesta a estos desafíos, se presenta la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR por sus siglas en inglés) como técnica diagnóstica con alto grado de especificidad y sensibilidad, carente de interferencia diagnóstica como suele suceder cuando se aplican otros métodos, entre ellos los convencionales parasitológicos y/o serológicos.

## PCR

Descrita por Mullis en 1983, supuso un gran avance para la universalización de las técnicas moleculares (Lejona y col., 2006). Esta técnica cuyo fundamento implica una síntesis continua de ADN *in vitro* combinando en un tubo de ensayo una muestra de ADN problema, oligonucleótidos específicos (o *primers*), desoxirribonucleótidos trifosfatos (dNTPs), una polimerasa (enzima Taq) en un tampón apropiado (buffer y MgCl<sub>2</sub>), se realiza en 3 pasos con temperaturas y tiempos diferentes (desnaturalización del ADN, hibridación de los *primers* y extensión enzimática), que repetidos sucesivamente le permiten a la polimerasa actuar en una sucesión de ciclos sin inactivarse. En cada repetición, se duplica la cantidad de ADN específico, así en una reacción típica de 30-40 ciclos se generan 230-240 moléculas del ADN de interés. El proceso de la PCR convencional (o simple) comienza con la selección de la fuente de ADN, una muestra biológica que debe ser sometida a un proceso de extracción de ácidos nucleicos mediante el rompimiento celular y liberación del ADN del resto de los componentes celulares. Luego de realizar la mezcla de reacción y someter a condiciones de ciclaje el ADN problema, se realiza la electroforesis horizontal en gel de agarosa para visualizar los fragmentos amplificados de interés, pudiendo utilizar para tal fin, bromuro de etidio, colorante que se intercala entre las bases del ADN y permite visualizarlo al ser iluminado con luz ultravioleta. Las bandas luminosas corresponden a los fragmentos de ADN amplificados. En la PCR convencional, se utilizan patrones de peso molecular conocido que permiten extrapolar el tamaño (pares de bases) de los fragmentos amplificados. La PCR posee características especiales que la hacen útil en la identificación y diagnóstico debido a su especificidad, sensibilidad, versatilidad, rapidez y accesibilidad. Es eficiente en la detección de un patógeno a nivel de género, caracterización de la especie, complejo o serotipo del organismo presente en una muestra determinada y en la identificación individual de un organismo (Guevara, 2004).

Las precauciones son importantes en el desarrollo de esta técnica. Debido a su elevada sensibilidad, es esencial evitar contaminaciones por ADN extraño que pudieran interpretarse en resultados falsos positivos. En este contexto, son necesarias separaciones físicas de los ambientes así como es conveniente el uso de puntas con filtros, guantes desechables y pipetas diferenciadas para manipular muestras con ADN y reactivos. El éxito de las

pruebas y la pulcritud de los resultados dependerán del cuidado que se tenga en evitar la contaminación. Es obligado el uso de controles positivos y negativos en cada tanda de reacciones (Guevara, 2004).

Al presente, los protocolos de PCR convencional están bastante extendidos, sin embargo, existen numerosas variantes de la técnica original, algunas de las cuales han sido empleadas con éxito, entre ellas: a) PCR anidada, nested PCR o nPCR; b) PCR con retrotranscripción, Reverse Transcription-PCR, o RT-PCR; c) PCR en Tiempo Real, Real Time PCR o PCR cuantitativa; d) PCR múltiple, multiplex PCR, o mPCR y e) LAMP PCR, Loop-Mediated Isothermal Amplification Method.

Desde su introducción, la PCR ha facilitado el desarrollo de una gran cantidad de sistemas de detección basados en ácidos nucleicos para identificar bacterias, virus y parásitos de importancia médica (Figueroa y Álvarez, 2003). Al presente, variadas son las publicaciones que han reportado el uso de la PCR para la detección de patógenos de interés veterinario y muchos de estos ensayos son comparados con detecciones serológicas y/o parasitológicas que evidencian su mayor especificidad, sensibilidad y velocidad, ventajas importantes que ofrece sobre los denominados métodos convencionales de diagnóstico (Lew y Jorgensen, 2005). Sin embargo, aunque una gran cantidad de métodos basados en PCR han sido descritos en la literatura, su aplicación no es todavía de rutina en los grandes laboratorios de diagnóstico (Figueroa y Álvarez, 2003; Lew y Jorgensen, 2005).

Tomando en consideración estos aspectos, la presente revisión pretende exponer algunas investigaciones que han sido desarrolladas utilizando la PCR para el diagnóstico de *B. abortus*, *Leptospira* spp., *M. bovis* y *M. paratuberculosis*, realizando comparación con los principales métodos de diagnóstico aun vigentes para cada microorganismo señalado. De igual modo serán reseñados aspectos epizootiológicos que permitirán entender la realidad acerca de estas infecciones en las unidades de producción ganadera (casuística y limitaciones diagnósticas), situaciones válidas que justificarían la necesidad de implementar una nueva metodología diagnóstica que como la PCR pueda dar soluciones, traducándose a nivel de laboratorio en ahorro de tiempo y recursos, y a nivel de campo, en una mayor y mejor rapidez de acción preventiva y/o implementación de estrategias de control.

### ***B. abortus***

Bacteria gramnegativa, agente causal de la brucelosis bovina, importante enfermedad con impacto en salud pública y animal a nivel mundial, siendo reportados cada año cerca de 500.000 nuevos casos (Zerva y col., 2001). La enfermedad en el bovino se traduce generalmente en una orquiepididimitis, aborto en el último tercio de la gestación, mastitis, retención placentaria, nacimiento de terneros débiles y descenso en la

producción de leche (Sutherland, 1980). *B. abortus* a su vez, se presenta en varios biogrupos (en la literatura se citan ocho, todos patógenos para el ganado bovino). En Venezuela el más importante es el biovar1, cuya prevalencia entre el ganado lechero ha sido reportada con valores hasta de 20%, y pérdidas económicas en más de 200 millones de dólares, estimación basada en la pérdida de producción de crías, producción de leche y costo de reposición (Vargas, 2002).

La brucelosis se reporta en el ganado venezolano desde 1930 pero fue en 1968 cuando el antiguo Ministerio de Agricultura y Cría publica una resolución para la campaña nacional de control (Vargas, 2002). Según los informes oficiales, la tasa de bovinos positivos a las pruebas serológicas se mantuvo por años con valores muy bajos, hecho que no reflejaba la verdadera situación de la enfermedad y que pudiera ser explicado al empleo erróneo de la prueba de aglutinación en placa (empleada como prueba oficial hasta 1987), puesto que la gran mayoría de los rebaños presentan infección crónica o han sido vacunados. Con el objeto de mejorar esta situación, a partir de 1999 se establece la vacunación de becerras de 3 a 8 meses con la cepa19 y el sacrificio de los animales reactores positivos a la nueva prueba oficial Rosa de Bengala (CardTest), obligatoria cada 6 meses a todos los bovinos hembras mayores de 20 meses. Los reactores positivos podrán ser confirmados con pruebas complementarias como aglutinación en tubo, 2-mercaptoetanol, fijación de complemento y ELISA competitivo (Vargas, 2002).

A pesar de identificarse todos los elementos para su control, la infección por *Brucella* es difícil erradicar entre un rebaño en parte por su carácter de cronicidad (D`Pool y Díaz, 2005) y en parte por la dificultad para lograr un diagnóstico confiable y oportuno. En virtud de los antecedentes planteados, se debe suponer que el diagnóstico de brucelosis requiere más de una prueba para llegar a interpretaciones confiables. Tradicionalmente, en la mayoría de los países latinoamericanos las pruebas serológicas son las más empleadas (Lavaroni, y col., 2004). Sin embargo, durante su desarrollo, se corre el riesgo de una baja sensibilidad y reacciones cruzadas con bacterias de los géneros *Yersinia*, *Vibrio*, *Salmonella* y *Escherichia*, causada por la gran similitud de los lipopolisacaridos presentes en la superficie de todas ellas (Mittal, 1980; Al-Attas y col., 2000; Bustamante y col., 2000), situación que conlleva a asumir como criterio de diagnóstico definitivo, el aislamiento del microorganismo a partir de líquidos corporales y leche, practica no común y no siempre exitosa (Leal- Klevezas y col., 1995).

Considerando las desventajas de los métodos mencionados, surge la PCR, ampliamente utilizada no solo para diagnóstico y diferenciación de la especie a partir de diferentes muestras biológicas, sino también en la diferenciación de cepas vacunales lo que resulta de gran ayuda en las campañas oficiales de erradicación (Rentería, y col., 2005).

La técnica de PCR provee una opción mas viable en el diagnostico de *B. abortus*, ha sido empleada junto a otras pruebas para la identificación de aislados a partir de muestras de cultivo, sangre, leche, tejido abortado, productos lácteos (queso) y sangre humana (Richtzenhain y col., 2002). La utilización en campo de *primers* sintetizados para la detección depende en gran medida del conocimiento epizootioológico propio de una región, ya que también es relevante la detección de algunos boivars y diferenciación de cepas vacunales (Romero y col., 1995; Lavaroni y col., 2004). La especificidad del método ha sido cotejada con otros microorganismos filogenética o serológicamente relacionados.

El concepto de PCR múltiple también ha sido empleado con éxito, utilizando un sistema de hasta cinco pares de *primers*, entre ellos, algunos propios de *B. abortus* y otros que permiten distinguir las cepas RB51 y S19 de otras cepas de *Brucella* en muestras de sangre y leche de rebaños serológicamente positivos y cuyos resultados han puesto en evidencia la innecesaria vacunación de bovinos adultos con la cepa RB51, ya que además de no resolver una infección natural, contribuiría a mantener dos cepas en el ambiente, comprometiendo así el control de la brucelosis (Rentería y col., 2005; Conde, y col., 2007).

Al presente, la PCR es poco empleada como herramienta diagnóstica a nivel de campo, a pesar de su reconocida ventaja sobre la prueba oficial Rosa de Bengala, y a sabiendas de su utilidad en fase inicial de la enfermedad donde las pruebas serológicas son poco confiables (Cevallos, y col., 2008).

### ***Leptospira* spp.**

Es la espiroqueta causante de la condición clínica conocida como leptospirosis, zoonosis que afecta a una gran variedad de animales domésticos, peridomésticos, selváticos y salvajes. En materia de salud pública es reconocida junto a la brucelosis, como dos de las más importantes zoonosis a nivel mundial, clasificándolas a la vez, dentro del grupo de enfermedades ocupacionales de mayor riesgo a sufrir por el hombre que está en contacto con la ganadería y sus subproductos (D`Pool y Díaz, 2005). Con distribución en casi todas las áreas geográficas del mundo, pero prevalencia en las zonas tropicales y subtropicales donde las condiciones ecológicas y climatológicas favorecen la supervivencia del microorganismo en el ambiente la mayor parte del año, casi sin variaciones estacionales y donde la fauna de los reservorios es más abundante - principalmente ratas- aun cuando otros animales como perros, cerdos, ovejas y/o bovinos juegan un papel preponderante en su diseminación y mantenimiento (Levett, 2001).

Descritas por vez primera en Japón (1916), en 1917 se crea el género con dos especies: *Leptospira interrogans* patógena para los animales y el hombre y *Leptospira biflexa*, organismo de vida libre no patógeno.

Actualmente se reportan entre 13 a 17 especies. En medicina veterinaria son las más importantes *L. interrogans* (serotipos bratislava, canicola, icterohaemorrhagiae y pomona), *Leptospira borgpetersenii* (serotipo hardjo) y *Leptospira kirschneri* (serotipo grippotyphosa) (D`Pool y Díaz, 2005).

La leptospirosis es una enfermedad infecto-contagiosa de alta morbilidad (hasta 100%) y baja mortalidad. Puede originar epidemias o casos esporádicos, como también brotes de diferentes magnitudes, alcanzando una letalidad generalmente baja en los cuadros clínicos graves y complicados, aunado a cuantiosas pérdidas económicas en la ganadería (Márquez y Fossi, 1996). En Venezuela se ha comprobado el contagio por *Leptospira* en bovinos en casi todos los estados de la geografía nacional, con una seroprevalencia global del 76% y en cuanto a serotipos, la prevalencia se ha estimado en *L. hardjo* (91%), *L. grippotyphosa* (11%), *L. castelloni* (8%), *L. canicola* (8%) y *L. icterohaemorrhagiae* (3%) (D`Pool y Díaz, 2005).

La infección causada por leptospiras origina una presentación clínica clasificada en etapa aguda, sub-aguda y crónica, conocimiento que reviste gran importancia al momento de seleccionar material biológico para el diagnóstico. La etapa aguda se caracteriza por hemoglobinuria, ictericia, anorexia y predisposición al aborto, junto a un cuadro septicémico en los becerros (acompañado de meningitis en algunos casos). Uno de los serotipos más comunes en este cuadro es *L. pomona*. La etapa sub-aguda, más común en adultos, es de aparición lenta, con reducción en la producción de leche y puede estar acompañada de coagulación sanguínea, aumento de los ganglios linfáticos, neumonía, enteritis y peritonitis. Esta sintomatología se debe generalmente a los serotipos *L. canicola*, *L. grippotyphosa* y *L. icterohaemorrhagiae*. La etapa crónica esta asociada con abortos, nacimientos débiles, conjuntivitis, muerte fetal, retención y/o cambios en la placenta que hacen que el feto se descomponga con rapidez. Responsables de este cuadro son *L. hardjo* y *L. sejroe* (Márquez y Fossi, 1996).

Por la sintomatología descrita, se debe suponer que la clínica no es concluyente para el diagnóstico, ya que además de ser coincidente o indicativo de otras patologías, debe acompañarse de nociones epidemiológicas. El examen directo mediante observación en campo oscuro o contraste de fase ha sido ampliamente utilizado, pero al igual que el cultivo (técnica también de gran valor) necesitan de un gran conocimiento clínico y epidemiológico de la infección ya que la certeza de un resultado depende en gran medida de la toma de una muestra de calidad (orina o sangre) en sintonía con la etapa clínica de la enfermedad (leptospiuria o leptospiremia). Entre otra desventaja, se cita el lento crecimiento de las leptospiras (mínimo dos meses), perjudicial si se quiere obtener un resultado con prontitud. En el diagnóstico serológico, las pruebas de aglutinación (tubo capilar, lisis, látex o microscópica), fijación de

complemento y ELISA por sí mismas no son concluyentes (Márquez y Fossi, 1996).

La detección de leptospiras empleando PCR ha venido trabajándose desde que se comprobó la utilidad de esta técnica para el diagnóstico de agentes infecciosos, habiéndose desarrollado numerosos *primers* a partir de genes específicos (ARNr 16S o 23S principalmente) o librerías genómicas; siendo factores importantes en dicho desarrollo, la posibilidad de identificar el serotipo que afecta una población ganadera y el empleo de material biológico diverso (bacterias provenientes de cultivo, orina, suero, fluido cerebro espinal, humor acuoso, semen y tejidos obtenidos por autopsia) dado el valor epidemiológico que la identificación del serotipo representa en salud pública en virtud que casi todas son potenciales patógenos humanos (Levett, 2001; Richtzenhain y col., 2002). A nivel de campo, numerosas reacciones de PCR simple han sido desarrolladas con éxito para la detección de ADN-*Leptospira* y comparadas con otros procedimientos diagnósticos, entre ellos el microbiológico, demostrando mayor porcentaje de positividad en parte al hecho de no depender de la viabilidad de las bacterias. Sin embargo, para el diagnóstico de campo las reacciones de mayor valor serían las obtenidas por un sistema mPCR dada la posibilidad de detectar asociaciones de *Leptospira* con otros agentes infecciosos, particularmente *Brucella* que permitan mayor simplicidad y rapidez del método y con ello la ventaja de ser empleado de rutina (Richtzenhain y col., 2002).

### ***Mycobacterium Boris***

Agente causal de la enfermedad infecto-contagiosa conocida como tuberculosis bovina o TBB y perteneciente al complejo de bacterias ácido-alcohol-resistentes *Mycobacterium tuberculosis* el cual agrupa, además de *M. bovis*, a *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium microti* y *Mycobacterium africanum*. Dentro del complejo, *M. bovis* es quien presenta el mayor número de hospedadores afectando a bovinos, caprinos, ovinos, equinos, cerdos, gatos, perros, primates y humanos (DeWard, 2005).

La principal vía por la cual se produce la infección es la erógena, ya que la bacteria se expulsa al exterior desde el tracto respiratorio de un animal infectado y pueden ser inspiradas por animales sanos o se pueden desecar en el ambiente. Se estima que el 80% de las infecciones ocurre por esta vía y el resto corresponde a las vías digestiva (los productos de origen animal son reservorios frecuentes de micobacterias con riesgo importante para la salud humana) (García-González y col., 2009), transplacentaria y sexual. Las tasas más elevadas de infección se encuentran en el ganado lechero y a nivel de frigoríficos y mataderos (Kantor y Ritacco, 2006). En general la tuberculosis bovina es una enfermedad de evolución crónica,



presenta un periodo de incubación variable, necesitándose meses o años para que la enfermedad se manifieste. La gran mayoría de los animales son clínicamente normales o sus manifestaciones cursan con síntomas indicativos de otras patologías como neumonía por aspiración, mastitis, leucosis, actinobacilosis, actinomycosis y metritis. Quizás el único signo característico sea la formación de granulomas nodulares conocidos como tubérculos (Fujimura y col., 2003; Álvarez y col., 2009).

La tuberculosis bovina ocasiona una disminución aproximada en un 20% de la producción de leche y carne y un 5% de la capacidad reproductiva de los rebaños, así como restricción en la venta y/o explotación de carne proveniente de animales enfermos. En la mayor parte de los países donde la tuberculosis bovina es un problema de salud pública, no se instaura tratamiento, por lo costoso, por ser a largo plazo, y quizá y más importante, por no lograr la eliminación total de la bacteria del organismo animal, siendo indispensable la prevención y el control (DeWard, 2005). En Venezuela, el control se realiza a través de un programa de erradicación orientado a la eliminación de la enfermedad de un rebaño o zona determinada que incluye la aplicación de las pruebas de diagnóstico oficiales y sacrificio de los animales positivos. Gracias a este programa, se han detectado cifras de prevalencia que pueden ser alarmantes. Sin embargo, solo en pocos estados se cumple con el programa a gran escala, existiendo un importante subregistro.

Citando al diagnóstico de la TBB, se puede entender que el diagnóstico clínico no sea concluyente. Entre los métodos de laboratorio, la tuberculina, prueba oficial, se caracteriza por ser efectiva en la detección temprana de casos pre-clínicos, es rápida de aplicar y útil cuando se trabaja con un volumen grande de animales. En casos positivos o dudosos, se puede ensayar en sangre una prueba de interferón-gamma (Buddle y col., 2009). Adicional, existen en el mercado otras pruebas serológicas como el ELISA, el examen directo de material sospechoso (coloración de Ziehl-Neelsen (ZN)) y aislamiento y cultivo bacteriológico en medios sólidos (Coletsos, Löwenstein-Jensen o similar) o líquidos (Bactec MGIT 960, BacT/ALERT 3D, VersaTREK o similar). En las dos últimas pruebas, es importante considerar una muestra de calidad y representativa para la obtención de resultados confiables (sangre, leche o nódulos linfáticos por ejemplo). El cultivo a pesar de considerarse la "prueba de oro" presenta problemas relacionados a la sensibilidad, detectándose probabilidad de aislamiento de micobacterias entre el 5% y 12% en animales sin lesiones visibles (DeWard, 2005; De la Rúa, 2006). Entre las pruebas moleculares, el análisis de espoligotipos es actualmente la estrategia más utilizada para tipificar genéticamente los miembros del complejo *M. tuberculosis*. La técnica, basada en la presencia o ausencia de alguna de las 43 secuencias espaciadoras localizadas en la región de las repeticiones directas (DR) de *M. tuberculosis*, es utilizada como herramienta en investigaciones epidemiológicas y desarrollo de programas de prevención por cuanto permite rastrear y comparar rápidamente el genotipo problema con los

existentes en bases de datos internacionales, permitiendo el análisis simultáneo de un número importante de cepas (De la Rúa, 2006; Kantor y Ritacco, 2006; Mancilla y col., 2006).

Las pruebas de diagnóstico para *M. bovis* se han enriquecido con el desarrollo de la PCR. La buena concordancia de ésta con el cultivo e identificación de lesiones compatibles y sugestivas de tuberculosis, permite sugerir su empleo para confirmar el diagnóstico de tuberculosis bovina. El empleo de la PCR para diagnóstico confirmativo de *M. bovis* permite incrementar la sensibilidad lo cual es de suma importancia para el control (Estrada-Chávez, y col., 2004).

Entre las variantes de la PCR, los sistemas de mPCR han sido desarrollados con confianza en los laboratorios de diagnóstico humano y veterinario dado el carácter zoonótico de la enfermedad. En tal sentido, mPCR se ha empleado para la diferenciación entre *M. bovis* y *M. tuberculosis* y probado entre poblaciones bovinas y humanas en áreas geográficas donde ambos coexisten y donde es importante el monitoreo y separación de los dos agentes (Shah y col., 2002; Fujimura y col., 2003, Bakshi, y col., 2005; Evans y col., 2007); así como en sitios de matanza para diferenciar en diferentes reservorios y lesiones post-mortem, las producidas por el complejo *M. tuberculosis* o el complejo *Mycobacterium avium* (De la Rúa, 2006).

Numerosas PCR simples han sido desarrolladas con éxito a partir del gen que codifica la proteína MPB70 (el antígeno más abundante en sobrenadantes de cultivo de cepas vacunales y virulentas de este complejo y ausente en otras micobacterias y géneros bacterianos) (Cousins y col., 1992). También, PCR específicos han sido desarrollados a partir de la secuencia específica IS1081 para la detección específica de *M. bovis* en muestras de tejidos post-mortem provenientes de varios reservorios (Ward y col., 1995). A pesar de estas investigaciones, es necesario seguir instrumentando esta técnica a un amplio conjunto de muestras biológicas, sin verse afectadas la sensibilidad y especificidad bajo distintas situaciones epidemiológicas (Estrada-Chávez y col., 2004).

### ***Mycobacterium paratuberculosis***

Sub-especie de *M. avium* y causal de la paratuberculosis bovina, PTBC o enfermedad de Johne. Este bacilo ácido-alcohol-resistente afecta a rumiantes domésticos y salvajes, causando una enfermedad crónica cuya característica principal es la pérdida de peso progresiva y la presencia de diarrea crónica, conducentes al desmejoramiento y finalmente la muerte del animal (Mannig y Collins, 2001; Rolo y col., 2001).

*M. paratuberculosis* (o Map), infecta a los macrófagos del intestino, ocasionando una enteropatía granulomatosa que da como resultado deficiente absorción de nutrientes esenciales, pérdida de proteínas y en consecuencia el cuadro clínico anteriormente descrito (Merkal, 1984, Cicuta

y col., 1995). En etapas avanzadas de la enfermedad, el Map se elimina a través de las heces y la leche de los animales afectados, por lo que cabe suponer que el principal mecanismo de transmisión lo representa la vía oral-fecal, aunque se ha señalado además, la transmisión intrauterina. La enfermedad presenta una fase subclínica, inaparente que puede prolongarse por años. Los animales generalmente se infectan a una edad temprana, principalmente en los primeros 35 días de vida, manifestándose los signos clínicos en la etapa productiva. Sin embargo, en crías provenientes de madres infectadas o de un ecosistema muy contaminado, puede observarse sintomatología entre los 12 y 18 meses de edad. Con distribución mundial, actualmente la PTBC se considera una enfermedad emergente a pesar de su reconocimiento desde 1895. El impacto negativo de la infección reviste importancia por su efecto sobre la economía de las explotaciones, expresada en disminución de la producción de leche, reducción del periodo de vida útil del bovino y predisposición a otras patologías (Alfaro y col., 2006).

Las cifras de prevalencia varían entre diferentes áreas geográficas a nivel mundial, reportándose desde 7% a 55%, mientras en Venezuela poco se conoce este índice, ya que comúnmente no se realizan pruebas rutinarias para su diagnóstico a pesar de ser reconocida la presencia del agente desde 1970 (Marín, y col., 1981; López, y col., 1996). Estudios focalizados han confirmado casos puntuales mediante hallazgos clínicos e histopatológicos, señalándose una prevalencia global entre 4% y 72% de acuerdo a las herramientas de diagnóstico utilizadas (Alfaro, 1999). Las mayores tasas de prevalencia se evidencian en sistemas de producción abiertos con entrada de animales por concepto de compra o préstamos sin cuarentena, control o pruebas diagnósticas, y en fincas con mal drenaje de aguas y zonas de mayor concentración de animales (Alfaro, 2001; Alfaro y col., 2006).

No existe tratamiento para la PTBC, el control se fundamenta en el diagnóstico para su confirmación y en el diseño de estrategias basadas en eliminación y separación de animales conjuntamente con medidas de bioseguridad (Alfaro, 2001). Adicionalmente, el microorganismo representa un potencial riesgo como zoonosis, asociándose con una patología similar en humanos conocido como Enfermedad de Crohn (Chiodini y Rossiter, 1996; Collins, 1997).

Para el diagnóstico de esta infección, se emplea una prueba intradérmica conocida como Johnina, siendo de valor limitado para diagnóstico individual debido a su baja especificidad, pero capaz de detectar reactores en los primeros estadios de la enfermedad, cuando hay abundantes bacilos en el intestino, por lo que es recomendada para tener una visión general de la situación de la enfermedad en una explotación (De Diego, 1991); de las pruebas serológicas, el test-ELISA es la prueba más empleada, detectando anticuerpos en animales clínicamente enfermos o subclínicamente infectados (Bernardelli y col., 1991), siendo actualmente la prueba

serológica más ampliamente empleada sobre todo en estudios poblacionales con mayor sensibilidad en animales adultos (tres o más años) y ventaja sobre la Johnina principalmente por lo tardío de la respuesta celular de ésta (Martinis y col., 2000). El cultivo fecal es un método efectivo para detectar infección en ganado aparentemente sano, con especificidad del 100% pero desventaja en la sensibilidad (50%) y lo tardío en la obtención de resultados (8-12 semanas) (Merkal, 1984; Vary y col., 1990). Actualmente se recomienda en materia de diagnóstico de laboratorio, la utilización de la prueba intradérmica para evaluar inmunidad celular (Bernadelli y col., 1999) y ELISA para evaluar inmunidad humoral (Soto y col., 2002).

Tomando en consideración lo anterior, y en concordancia con lo expuesto para las infecciones anteriores, no existe una metodología única de diagnóstico para la PTBC, y al igual que anteriormente se ha presentado, las pruebas moleculares en particular la PCR, ha sido empleada con éxito en el diagnóstico de *M. paratuberculosis* y su diferenciación con *M. bovis* con quien presenta la mayor similitud antigénica (Vary y col., 1990). Una condición a tener presente en este diagnóstico es que la naturaleza de la muestra (por lo general la fecal) pudiera llevar a la obtención de falsos positivos por los constituyentes que esta presenta. Entre los PCR desarrollados, figura con éxito los que evalúan la secuencia específica de *M. paratuberculosis* designada como IS900, confiables en el diagnóstico de PTBC en reservorios bovinos, ovinos y humanos en fase clínica y subclínica y con ventaja adicional de poder emplear tejido, leche y sangre además de heces como material biológico de partida para la obtención de ADN, disminuyendo así la presencia de contaminantes (Vary y col., 1990; Sanderson, y col., 1992; Garrido y col., 2000; Pillai y Jayarao, 2002; Juste y col., 2005; Bhide y col., 2006).

## A MANERA DE CONCLUSION

El problema que supone la detección de los agentes infecciosos reseñados que comprometen la salud del rebaño bovino, pudiera dársele solución mediante la herramienta diagnóstica PCR, preservando la salud del rebaño al favorecer la actuación preventiva y/o curativa adecuada y oportuna. Como parte de esta solución, son necesarios el desarrollo y estandarización de nuevos sistemas de PCR que faciliten la detección de agentes infecciosos causales de la brucelosis, leptospirosis, tuberculosis y paratuberculosis bovinas a partir de diferentes muestras biológicas, con énfasis especial en muestras sanguíneas, y evaluando las herramientas diseñadas al cotejarlas con los tradicionales métodos diagnósticos empleados en amplias explotaciones ganaderas.

## REFERENCIAS

1. Alfaro, C. 1999. Informe de Gestión Anual INIA-Monagas. Mimeografiado. 45 p.
2. Alfaro, C. 2001. Bioseguridad como componente de los programas sanitarios para minimizar el riesgo de TBC y PTBC en las explotaciones ganaderas. En: Boletín Agropecuario, Fundación INLACA. Año 3. N° 11. 31-34 p.
3. Alfaro, C.; de Rolo, M.; Clavijo, A.; Valle, A. 2006. Caracterización de la paratuberculosis bovina en ganado doble propósito de los llanos de Monagas, Venezuela. *Zootecnia Trop.* 24(3):321-332.
4. Al-Attas R.; Al-Khalifa, M.; Al-Qurashi, A.; Badawy, M.; Al-Gualy, N. 2000. Evaluation of PCR culture and serology for the diagnosis of acute human brucellosis. *Ann. Saudi Med.* 20(3):224-228.
5. Alvarez, A.; Estrada-Chavez, C.; Flores-Valdez, M. 2009. Molecular findings and approaches spotlighting *Mycobacterium bovis* persistence in cattle. *Vet Res.* 40(3):22.
6. Añez, N.; Cristante, G.; Bolívar, A.M.; Añez-Rojas, N. 2007. Utilización de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) para el diagnóstico de tripanosomiasis y anaplasmosis en muestras de sangre de animales domésticos. Taller Teórico Práctico. UNESUR. Santa Bárbara del Zulia. 29 pag.
7. Arias C. 2003. Principales campañas de erradicación de enfermedades infectocontagiosas en bovinos y equinos. En: Taller sobre aspectos productivos y sanitarios de la ganadería bovina y otras especies. Memorias. ASODEGAA. El Vigía, Mérida. Venezuela.
8. Bakshi, C.; Shah D.; Verma, R.; Singh, R.; Malik, M. 2005. Rapid differentiation of *Mycobacterium bovis* and *Mycobacterium tuberculosis* based on a 12.7-kb fragment by a single tube multiplex-PCR. *Vet. Microbiology.* 109(3-4):211-216.
9. Bernardelli, A.; Nader, A.; Moreira, A.; Debenedetti, R.; Estévez M. 1991. Evaluación de distintas técnicas para eliminar la paratuberculosis de un rodeo de cría. *Rev. Med. Vet.* 72(3):223-230.
10. Bhide, M.; Chakurkar, E.; Tkacikova, L.; Barbuddhe, S.; Novak, M.; Mikula, I. 2006. IS900-PCR-based detection and characterization of *Mycobacterium avium* Subs. *paratuberculosis* from buffy coat of cattle and sheep. *Veterinary Microbiology.* 112:33-41.
11. Buddle, B.; Livingstone, P.; de Lisle, G. 2009. Advances in ante-mortem diagnosis of tuberculosis in cattle. *N. Z. Vet. J.* 57(4):173-80.
12. Bustamante, S.; Salazar, H.; Díaz, A.; Manzano, C.; Pérez, G.; Hernández, A. 2000. Estudio bacteriológico y serológico de brucelosis en vacas revacunadas con dosis reducida de cepa S19 de *Brucella abortus*. *Tec Pecuaria Mex.* 38(1):35-42.
13. Cevallos, O.; Motte, E.; Cedeño, V.; Carranza, M.; Canchignia, H.; Saucedo, S. 2008. Implementación de la PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa) para el diagnóstico de la brucelosis de bovinos en el Ecuador. *Ciencia y Tecnología.* 1:31-36.

14. Cicuta, M.; Boheringer, S.; Roibón, W.; Bernardelli, A.; Bakos, E.; Benítez, M.; Kunert, J.; Aragón, L. 1995. Paratuberculosis in cattle and sheep of the North East of Argentina. The Paratuberculosis Newsletter. 7(1): 18-23.
15. Chiodini, R.; Rossiter, J. 1996. Paratuberculosis: a potential Zoonosis?. Vet. Cli. North Am. 12: 457-467.
16. Collins, M. 1997. *Mycobacterium paratuberculosis*: A potential food-borne pathogen?. Journal of Dairy Science. 80 (12): 3445-3448.
17. Conde, S.; Hollender, D.; Salustio, E.; Samartino, L. 2007. Desarrollo de PCR multiplex para la identificación de *Brucella sp.* XI Congreso Argentino de Microbiología. Córdoba, Argentina.
18. Cousins, D.; Wilton, S.; Francis, B.; Gow, B. 1992. Use of Polymerase Chain Reaction for Rapid Diagnosis of Tuberculosis. J. Clin. Microbiol. 30(1): 255-258.
19. De Diego, A. 1991. Enfermedades de los bovinos. Editorial Hemisferio Sur. S.A. 1° Edición. Buenos Aires, Argentina.
20. De la Rúa, R. 2006. Human *Mycobacterium bovis* infection in the United Kingdom: incidence, risks, control measures and review of the zoonotic aspects of bovine tuberculosis. Tuberculosis. 86: 77-109.
21. De Ward, J. 2005. Tuberculosis bovina. En: Manual del Ganadería Doble Propósito. Ediciones Astro Data, S.A. Maracaibo, Venezuela. 364-369.
22. D´Pool, G.; Diaz, D. 2005. Brucelosis. En: Manual del Ganadería Doble Propósito. Ediciones Astro Data, S.A. Maracaibo, Venezuela. 295-299.
23. Estrada-Chávez, C.; Díaz, F.; Arriaga, C.; Villegas, N.; Pérez, R.; González, D. 2004. Concordancia de la PCR y métodos rutinarios para el diagnóstico de tuberculosis bovina. Vet. Mex. 35(3): 225-236.
24. Evans, J.; Smith, E.; Banerjee, A.; Smith, R.; Dale, J.; Innes, J.; Hunt, D.; Tweddell, A.; Wood, A.; Anderson, C.; Hewinson, R.; Smith, N.; Hawkey, P.; Sonnenberg, P. 2007. Cluster of human tuberculosis caused by *Mycobacterium bovis*: evidence for person-to-person transmission in the UK. Lancet. 369: 1270-76.
25. Figueroa, J.V.; Álvarez, J.A. 2003. Investigaciones sobre la aplicación de técnicas moleculares en el diagnóstico y control de la babesiosis bovina. Ciencia Veterinaria. 9(4): 75-104.
26. Fujimura, C.; Anno I.; de Andrade S.; Roxo, E.; Morlock, G.; Cooksey, R. 2003. Isolation and identification of *Mycobacteria* from livestock specimens and milk obtained in Brazil. Mem. Inst. Oswaldo Cruz. 98(3): 319-323.
27. García, H.; Mendoza-León, A. 2000. Diagnóstico molecular en protozoarios Kinetoplastida. Principios y aplicaciones. Rev. Fac. Cs. Vets. UCV. 41: 109-130.
28. García-González, P.; Varela, M.; Palacios, J.; Rodrigo, L. 2009. Tuberculosis peritoneal por *Mycobacterium bovis* en paciente cirrótico. Gastroenterología y Hepatología. 32(07).

29. Garrido, J.; Cortabarría, N.; Oguiza, J.; Aduriz, G.; Juste, R. 2000. Use of a PCR method on fecal samples for diagnosis of sheep paratuberculosis. *Veterinary Microbiology*. 2034:1-8.
30. Guevara, P. 2004. Identificación y Diagnóstico Molecular de Microorganismos. Manual de laboratorio. Proyecto Iniciativa Científica del Milenio. Red de Innovación Tecnológica IDMM.
31. Juste, R.; Garrido, J.; Guijo, M.; Elguezabal, N.; Aduriz, G.; Atxaerandio, R.; Sevilla, I. 2005. Comparison of blood polymerase chain reaction and enzyme-linked immunosorbent assay for detection of *Mycobacterium avium* Subs. *paratuberculosis* infection in cattle and sheep. *J. Vet. Diagn. Invest.* 17:354-359.
32. Kantor, I.; Ritacco, V. 2006. An update on bovine tuberculosis programmes in Latin American and Caribbean countries. *Veterinary Microbiology* 112:111-118.
33. Lavaroni, O.; Aguirre, N.; Manzini, V.; Lugaresi, C.; Torioni, S. 2004. Evaluación de la reacción en cadena de la polimerasa para el diagnóstico de la brucelosis en un rebaño lechero infectado con *Brucella sp.* *Res. Argentina de Microbiol.* 36:101-106.
34. Leal-Klevezas, D.; Martínez-Vázquez I.; López-Merino, A.; Martínez-Soriano J. 1995. Single-strip PCR for detection of *Brucella spp* from blood and milk of infected animals. *J. Clin. Microbiol.* 33(13):3087-3090.
35. Levett, P. 2001. Leptospirosis. *Clin. Microbiol. Rev.* 14(2):296-326.
36. Lew, A.; Jorgensen, W. 2005. Molecular approaches to detect and study the organisms causing bovine tick borne diseases: babesiosis and anaplasmosis. *Afr. J. Biotechnol.* 4(4):292-302.
37. López, N.; Rolo, M.; Palencia, L. 1996. Paratuberculosis o enfermedad de Jhone, un problema sanitario económico que afecta la ganadería venezolana. 3<sup>er</sup> Congreso de Ciencias Veterinarias. "Eduardo Mendoza Goiticoa". Maracay, Ven. Memorias. 34-41p.
38. Mancilla, M.; Martínez, A.; Palavecino, C.; Rehnen, G.; Lucero, P.; León, G.; Zárraga, A. 2006. Tuberculosis: Variantes genéticas de *Mycobacterium tuberculosis* aisladas de pacientes de la Xa Región de Chile. *Rev. Chil Infect* 23(3):220-225.
39. Mannig, E.; Collins, M. 2001. *Mycobacterium avium subesp. Paratuberculosis*: el patógeno, su patogenia y su diagnóstico. *Rev. Sci. Tech. OFF. Int. Epiz.* 20(1):133-150.
40. Marín, C.; López, N.; Jelambi, F.; Lozano, O.; Álvarez, L.; Martínez, A. 1981. Investigaciones sobre epidemiología de la paratuberculosis en Venezuela. Primer Seminario sobre Avances de la Investigación de Bovinos de Carne en Venezuela. Maracay, Ven.
41. Márquez, N.; Fossi, L. 1996. La leptospirosis como una de las principales enfermedades reproductivas de los bovinos de carne en Venezuela. En: I Taller regional de leptospirosis bovina Sur del Lago. Memorias. ASODEGAA. El Vigía-Venezuela.
42. Márquez-Quivera, N. 2000. Principales enfermedades del bovino en Venezuela y su control preventivo. Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Central de Venezuela, Maracay.

43. Martinis, D.; Cicuta, M.; Boehringer, S.; Paolicchi, F.; Morsella, C. 2000. Paratuberculosis en Ganado lechero de Corrientes. Universidad Nacional del Noreste. Facultad de Ciencias Veterinarias. Comunicaciones Científicas y Tecnológicas. Argentina. <http://www.unne.edu.ar/cyt/veterinarias/v-049.pdf>
44. Medellín-Ledezma, J. 2002. Manejo y control de las principales enfermedades bacterianas y por hemoparásitos en sistemas de producción de bovinos y pequeños rumiantes en Tamaulipas. Laboratorio de diagnóstico clínico de grandes especies. Facultad de medicina veterinaria.
45. Merkal, R. 1984. Paratuberculosis. Advances in cultural serologic, and vaccination methods. JAVMA. 184(8):939-943.
46. Mittal, K.; Tizard, R. 1980. Studies on the relationship between *Yersinia enterocolitica* IX and *Brucella abortus* agglutinins in naturally infected animals. Res vet. Sci. 28(3):311-314.
47. Pillai, S.; Jayarao, B. 2002. Application of IS900 PCR for detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* directly from raw milk. J. Dairy Sci. 85:1052-1057.
48. Rentería, T.; Organes, H.; Licea, A.; Medina, G.; Nielsen, K.; Montaña, M.; Moreno, J.; Pujol, L. 2005. Evaluación de la prueba reacción en cadena de la polimerasa (PCR) a partir de muestras de leche y cultivos puros en el diagnóstico de la brucelosis bovina. Tec. Pecu. Mex. 43(1):117-126.
49. Rey, C. Hemoparasitosis en América Latina: El caso Venezuela. 2004. Red Electrónica de Garrapatas y Enfermedades Transmitidas por Garrapatas para América Latina y el Caribe. RedEctopar.
50. Richtzenhain, L.; Cortez, A.; Heinemann, M.; Martins, R.; Miyoshi, S.; Vasconsellos, S.; Morais, Z.; Scarcelli, E.; Genovez, M. 2002. A multiplex for the detection of *Brucella spp* and *Leptospira spp* DNA from aborted bovine fetuses. Veterinary Microbiology. 87:139-147.
51. Rolo, A.; Clavijo, C.; de Noguera, C.; Bello, A.; Sandoval, J.; Martinez, L.; Peroza, C.; Noguera, R. 2001. Detection of paratuberculosis in bovine herds of Zulia state in Venezuela. Proceedings International Union of Microbiological Societies World Congresses, X<sup>th</sup> International Congress of Bacteriology an applied Microbiology , p 369, 27 july al 1 august 2002, Le Palais des Congrès de Paris.
52. Romero, C.; Gamazo, C.; Pardo, M.; López-Goñi, I. 1995. Specific detection of *Brucella* DNA by PCR. J. Clin. Microbiolol. 33(3):615-617.
53. Sanderson, J.; Moss, M.; Tizard, M.; Hermon-Taylos, J. 1992. *Mycobacterium paratuberculosis* DNA in Crohn´s disease tissue. Gut. 33:890-896.
54. Shah, D.; Verma, R.; Bakshi, C.; Singh, R. 2002. A multiplex-PCR for the differentiation of *Mycobacterium bovis* and *Mycobacterium tuberculosis*. FEMS. Microbiol Lett. 214(1):39-43.
55. Soto, J.; Kruze, J.; Leiva, S. 2002. Comparación de tres métodos de diagnóstico de paratuberculosis bovina en rebaños lecheros infectados. Arch. Med. Vet. 34(2):253-263.



56. Sutherland, S. 1980. Immunology of bovine brucellosis. Vet. Bull. 50(5):359-369.
57. Vargas, 2002. Situación epidemiológica de la brucelosis en Venezuela. Gaceta de Ciencias Veterinarias.
58. Vary, P.; Andersen, P.; Green, E.; Hermon-Taylor, J.; McFadden, J. 1990. Use of highly specific DNA probes and the Polymerase Chain Reaction to detect *Mycobacterium paratuberculosis* in Johne's disease. J.Clin.Microbiol. 28(5):933-937.
59. Ward, B.; Collins, D.; de Lisle, G. 1995. Detection of *Mycobacterium bovis* in tissues by polymerase chain reaction. Veterinary Microbiology. 43(2-3):227-240.
60. Zerva, L.; Bourantas, K.; Mitka, S.; Kansouzidou, A.; Legakis, NJ. 2001. Serum is the preferred clinical specimen for diagnosis of human brucellosis by PCR. J. Clin. Microbiol. 39(4):661-1664.

### REDVET: 2013, Vol. 14 N° 3

Recibido 08.08.2012 / Ref. prov. AGO1208-NOV1220\_RED VET / Aceptado 26.02.2013  
Ref. def. 031301\_RED VET / Publicado: 01.03.2013

Este artículo está disponible en <http://www.veterinaria.org/revistas/redvet/n030313.html>  
concretamente en <http://www.veterinaria.org/revistas/redvet/n030313/031301.pdf>

REDVET® Revista Electrónica de Veterinaria está editada por Veterinaria Organización®.

Se autoriza la difusión y reenvío siempre que enlace con Veterinaria.org® <http://www.veterinaria.org> y con  
REDVET®- <http://www.veterinaria.org/revistas/redvet>