

# Investigación de *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* en leche ultrapasteurizada para consumo humano

MAGNANO, G.G.<sup>1</sup>; MACIAS, A.F.<sup>1</sup>; PEREZ ZAVALA, V.<sup>1</sup>; SCHNEIDER, M.O.<sup>1</sup>; BÉRGAMO, E.G.<sup>1</sup>  
GIRAUDO, J.A.<sup>1</sup>; STICOTTI, E.<sup>1</sup>; MACIÓ, M.<sup>1</sup>; BERNARDELLI, A.<sup>2</sup>

## Resumen

Actualmente se vincula al *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* como potencial agente etiológico implicado en la enfermedad de Crohn en humanos. Una de las vías de ingreso sería a través de la ingestión de leche contaminada. El objetivo fue evaluar la presencia de Map en leche comercial homogeneizada y ultrapasteurizada para consumo humano en supermercados de la ciudad de Río Cuarto, Córdoba, Argentina. Se muestrearon 98 envases de 1 litro de leche entera homogeneizada y ultrapasteurizada de seis marcas comerciales. Previa descontaminación con el método de Cornell modificado, se sembraron en medio de cultivo Herrold con y sin micobactina. Todas las muestras fueron negativas. Como posibles causas de estos resultados se discuten: el origen de la leche y su probable muy baja carga de micobacterias, la eficacia de la pasteurización, el proceso en el laboratorio, entre otras.

*Palabras clave:* (paratuberculosis), (micobacterias), (leche), (zoonosis emergente).

Research of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in ultrapasteurized milk for human consumption

## Summary

Currently, *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* is linked to Crohn's disease in humans as a potential etiologic agent. One route of infection to be considered is by the ingestion of contaminated milk. The objective of the present work was to evaluate Map's presence in commercial homogenized and ultrapasteurized milk for human consumption in supermarkets in the city of Río Cuarto, Córdoba, Argentina. Ninety eight packages of 1 liter of entire, homogenized and ultrapasteurized milk of six commercial brands were sampled. After decontamination by the modified Cornell's method, the samples were cultured in Herrold's medium with and without micobactin. All samples were negative. Possible causes of this result such as the origin of the milk and its probable very low amount of micobacterias, the efficiency of the pasteurization, the processing in the laboratory, among others are here discussed.

*Key words:* (paratuberculosis), (micobacterias), (milk), (emergent zoonosis).

<sup>1</sup> Departamento de Patología Animal, Facultad de Agronomía y Veterinaria, Universidad Nacional de Río Cuarto, Ruta 36, Km 601, Río Cuarto, Córdoba, Argentina. gmagnano@ayv.unrc.edu.ar <sup>2</sup> Laboratorio de Micobacterias, DILAB- SENASA, Martínez, Buenos Aires Argentina.

Recibido: 13.11.2008 - Aceptado: 16.03.2010

## Introducción

*Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (Map) es el agente etiológico de la enfermedad de Johne o paratuberculosis. Esta afecta a rumiantes y a otros animales salvajes y se caracteriza por una ileocolitis crónica granulomatosa que lleva a diarrea, pérdida de peso, debilitamiento progresivo y muerte<sup>1,3</sup>.

La paratuberculosis ha adquirido en la actualidad suma importancia ya que existe una probable transmisión a los humanos. Si bien no está clasificado como un agente zoonótico se vincula al Map como potencial agente etiológico implicado en la enfermedad de Crohn en humanos. Una de las vías de ingreso importante sería a través de la ingestión de leche<sup>2,12,18</sup>.

Algunos trabajos realizados indican que Map es inactivado en el proceso de pasteurización<sup>15</sup>. Pero otros han indicado que esa inactivación no es completa<sup>4,7,8,14,17</sup>. Los métodos de pasteurización utilizados en estos estudios fueron la ultrapasteurización, en la cual la leche es sometida 2 a 4 segundos a una temperatura de 135-140°C y el sistema HTST (*high temperature short time*) en el cual se calienta la leche a 72°C por un período de 15 segundos.

Las condiciones de tiempo y temperatura de la pasteurización fueron originalmente diseñadas para destruir al *Mycobacterium bovis*, agente causal de la tuberculosis en el ganado bovino y patógeno para el hombre. Se supuso que Map también sería efectivamente inactivado durante el proceso.

La supervivencia de Map en leche pasteurizada puede atribuirse principalmente a sus características fenotípicas. Aparentemente la resistencia al tratamiento de la pasteurización de Map estaría influenciada por su tendencia a agruparse formando verdaderos nidos. Las bacterias en el centro de este típico agrupamiento estarían protegidas y requerirían otras alternativas para su inactivación, ya que está comprobado que cada nido contiene más de 10.000 micobacterias y que una proporción de ellas sobrevive a la pasteurización<sup>11</sup>.

Por otra parte el número de unidades formadoras de colonias (ufc) de Map presentes en la leche cruda provenientes de la eliminación del agente por esta vía y por la posible contaminación fecal de la misma durante el ordeño, podrían influenciar en la eficacia del tratamiento de pasteurización<sup>10</sup>.

Hay trabajos que demostraron la presencia de Map en leche comercial. Grant et al. (2002) en Reino Unido y Ellingron et al. (2005) en E.E U.U. encontraron un 2,0% y 2,8% respectivamente. En la Argentina Paolicchi et al. (2005) observaron que el 2,9% de 70 muestras presentaron crecimiento de Map.

El objetivo fue evaluar la presencia de Map en leche comercial homogeneizada y ultrapasteurizada para consumo humano en supermercados de la ciudad de Río Cuarto, Córdoba.

## Materiales y métodos

Para este trabajo se utilizaron 98 envases de 1 litro de leche entera homogeneizada y ultrapasteurizada de seis marcas que se comercializan a nivel nacional y que se vendían al público en distintos supermercados de la ciudad de Río Cuarto, Córdoba, Argentina. El muestreo se realizó mensualmente durante todo el año 2006, consistiendo en la selección al azar de los envases en la góndola.

Las muestras fueron decontaminadas basándose en el método de Cornell modificado como se describe a continuación: de cada envase de leche se tomó una alícuota de 35 ml que se colocó en un tubo plástico estéril de ultracentrífuga, se agregó 7 ml de citrato de sodio al 18% y se mezcló. Luego se centrifugó durante 30 minutos a 3500g. Se descartó el sobrenadante y al pellet se le agregó 700 microlitros de citrato de sodio al 3% y 500 microlitros de cloruro de benzalconio al 0,3%. Esto fue colocado en estufa a 37°C durante 24 horas. Transcurrido ese tiempo, nuevamente se centrifugó a 3500g durante 30 minutos. Se descartó el sobrenadante y el pellet fue

resuspendido en 1 ml de agua destilada estéril. Se realizó una tinción de Ziehl Neelsen (Z-N) previa y se sembró cada muestra en tres tubos con medio de cultivo Herrold con micobactina y en un tubo con medio de Herrold sin micobactina. Los mismos se colocaron en estufa a 37°C. Los cultivos fueron observados semanalmente durante 6 meses en busca de crecimiento macroscópico. Al momento de la eliminación, a cada tubo se le realizó tinción de Z-N para su diagnóstico bacterioscópico.

Antes de comenzar el trabajo y con el fin de poner a punto la técnica de decontaminación, se realizaron artificialmente dos controles positivos mediante la inoculación de una cepa de referencia ATCC 19698 de *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. Para esto, 35 ml de leche comercial homogeneizada y ultrapasteurizada fueron inoculados con  $1,5 \times 10^8$  ufc; luego se realizó el mismo proceso de decontaminación química, siembra y observación que en las demás muestras.

El proyecto se desarrolló dentro del programa de Salud Bovina financiado por el SECyT de la Universidad Nacional de Río Cuarto.

## Resultados

Las 98 muestras de leche no presentaron crecimiento macroscópico observable y todas fueron negativas a la tinción de Z-N tanto las previas a la siembra como las que se realizaron pasados los seis meses de cultivo.

Los dos controles positivos presentaron crecimiento macroscópico. El mismo fue evidente recién a los 5 meses de la siembra mientras que las tinciones de Z-N fueron positivas cuando transcurrieron 4 meses de cultivo.

## Discusión y conclusión

Entre las posibles causas de estos resultados podemos citar:

\* que la leche provenga de establecimientos cuyos animales no padezcan la enfer-

medad o que la prevalencia de la misma sea muy baja. Con respecto a esto último es necesario considerar que en campos donde se aplicaron o aplican actualmente manejos sanitarios para erradicar la tuberculosis de los bovinos y, como ambas enfermedades pueden dar reacciones cruzadas a la prueba de intradermorreacción con PPD bovino, existe la probabilidad de eliminar indirectamente animales con paratuberculosis.

\* que la leche provenga de animales infectados pero que en ese momento del ordeño no estaban eliminando micobacterias ya que la salida de microorganismos por esta vía es discontinua. Streeter et al. (1995) trabajando en un rodeo con alta prevalencia de paratuberculosis, observaron que del total de animales clínicamente sanos que eliminaban *Map* por materia fecal, solo el 8% de los cultivos de leche fueron positivos.

\* que las cargas de micobacterias en la leche, previa a su procesamiento, sean muy bajas. Algunos estudios indican que *Map* sobrevive a la pasteurización sólo cuando se encuentra presente en un número mayor a 10 ufc/ml de leche<sup>8</sup>.

\* que existió una reducción de la carga de *Map* en el procesamiento de laboratorio y su consecuente aislamiento. El método para el cultivo requiere un tratamiento de decontaminación química que tiene un efecto adverso en la viabilidad de cierta proporción de micobacterias<sup>5</sup>. Si bien los controles positivos realizados demostraron viabilidad posterior al tratamiento, estos fueron inoculados con  $1,5 \times 10^8$  ufc y es probable que se haya superado en este caso el número de colonias que podrían encontrarse en una leche comercial contaminada.

En el presente estudio no se estimó la cantidad de bacilos (ufc) requerida en la muestra para obtener cultivos positivos. Esta limitación lleva a concluir que se obtuvo un resultado negativo, que no descarta la posibilidad de que haya *M.avium subsp. paratuberculosis* en leche ultrapasteurizada. Estas investigaciones pueden ampliarse usando controles positivos cuantitativos que permitan establecer la sensibilidad del método; y examinando muestras de leche representativas de grandes volúmenes, con lo que se aumentará la capacidad de detectar el Map.

\* que en nuestro trabajo se utilizaron leches homogeneizadas y ultrapasteurizadas a escala comercial, ya que la mayoría de los trabajos con los que contamos son a partir de equipos pasteurizadores de laboratorio, los cuales tienen algunas diferencias con los comerciales principalmente en el proceso de homogeneización que sería clave para la reducción de los agrupamientos de las micobacterias<sup>8</sup>.

Debido a que en nuestro país no se cuenta con muchos trabajos relacionados con el tema y los resultados que hemos obtenido difieren de otros estudios, consideramos que se hace necesario continuar investigando para conocer la real calidad sanitaria de este producto de vital importancia para el consumo humano.

## Bibliografía

- Blood, D.; Henderson, J.; Radostits, O. *Medicina Veterinaria*. 6ª Edición. Nuevo Editorial Interamericana. México, 1998:704-710.
- Collins, M. 1997. Symposium: On farm food safety *Mycobacterium paratuberculosis*: a potencial food-borne pathogen?. *J. Dairy Sci* 80:3445-3448
- Chiodini, R.; van Kruiningen H. Characterization of *Mycobacterium paratuberculosis* bovine, caprine, and ovine origin by gas-liquid chromatographic analysis of fatty acids in whole-cell extracts. *Am. J. Vet. Res.* 1985. 46:1980-1989.
- Chiodini, R.; Hermond-Taylor, J. The thermal resistance of *Mycobacterium paratuberculosis* in raw milk under conditions simulating pasteurization. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigations*, 1993; 5:629-631.
- Dundee, L., Grant, I.; Ball, H.; Rowe, M. Comparative evaluation of four decontamination protocols for the isolation of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* from milk. *Lett. Appl. Microbiol.* 2001; 33:173-177.
- Ellingson, J.; Anderson, J.; Koziczkowski, J.; Radcliff, R.; Sloan, S.; Allen, S.; et. al. Detection of viable *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in retail pasteurized whole milk by two culture methods and PCR. *J Food Prot.* 2005; 68:966-72.
- Gao, A.; Mutharia, L.; Chen, S.; Rahn, K.; Odumero, J. Effect of pasteurization on survival of *Mycobacterium paratuberculosis* in milk. *Dairy Sci.* 2002; 85:3198-3205.
- Grant, I.; Ball, H.; Rowe, M. Effect of high temperature, short time pasteurization on milk containing low numbers of *Mycobacterium paratuberculosis*. *Lett. Appl. Microbiol.* 1998; 26:166-170.
- Grant, I.; Hitchings, E.; McCartney, A.; Ferguson, F.; Rowe, M. Effect of commercial-scale-high-temperature, short-time pasteurization on the viability of *Mycobacterium paratuberculosis* in naturally infected cows milk. *Appl. Environ. Microbiol.* 2002; 68:602-607.
- Grant, I.; Williams, A.; Rowe, M.; Muir, D. Efficacy of various pasteurization time-temperature conditions in combination with homogenization on inactivation of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in milk. *Appl. Environ. Microbiol.* 2004; 71:2853-2861.
- Grant, I.; Rowe, M. Effect of chemical decontamination and refrigerated storage on the recovery of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* from heat-treated milk. *Lett. Appl. Microbiol.* 2004; 38:283-288.
- Hermond-Taylor, J. *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* and its relation to Crohn's disease. 7<sup>th</sup> *Internacional Colloquium on Paratuberculosis*, 2002. Bilbao, España.
- Paolicchi, F.; Cirone, K.; Morsella, C.; Gioffre, A.; Cataldi, A.; Romano, M. Isolation of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* from commercial pasteurized milk. 8<sup>th</sup> *Internacional Colloquium on Paratuberculosis*, 2005. Copenhagen, Dinamarca.

14. Pearce, L.; Truong, H.; Crawford, R.; Yates, G.; Cavaignac, S.; De Lisle, G. Effect of turbulent-flow pasteurization on survival of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* added to raw milk. *Environ. Microbiol.* 2001; 67:3964-3969.
15. Stabel, J.; Pearce, L.; Chandler, R.; Hammer, P.; Klinjn, N.; Cerf, O.; Collins, M.; Heggum, C.; Murphy, P. Destruction by heat of *Mycobacterium paratuberculosis* in milk and milk products. *Bull. Int. Dairy Fed.* 2001; 362:53-60.
16. Streeter, R.; Hoffsis, G.; Bech-Nielsen, S.; Shaulaw, W.; Rings, D. Isolation of *Mycobacterium paratuberculosis* from colostrum and milk of subclinically infected cows. *Am. J. Vet. Res.* 1995; 56(10):1322-1324.
17. Sung, N.; Collins, M. Thermal tolerance of *Mycobacterium paratuberculosis*. *Appl. Environ. Microbiol.* 1998; 64:999-1005.
18. Sweeney, R.; Whitlock, R.; Rosenberger, A. *Mycobacterium paratuberculosis* cultured from milk and supra mammary lymph nodes of infected asymptomatic cows. *J. Clin. Microbiol.* 1992; 30:166-171.