



ALTERACIONES DEL PERFIL PROTEICO DE LA LECHE POR LA PRESENCIA DE MYCOBACTERIUM AVIUM PARATUBERCULOSIS

Alterations of the milk protein profile due to the presence of Mycobacterium Avium Paratuberculosis

Sonia Andrea Villamar Manrique,

Médico Veterinario y Zootecnista,
MA Producción Animal, Cátedra de Inmunología,
Facultad de Ciencias Veterinarias Universidad de Buenos Aires (UBA),
CABA, Argentina, svillamarmanrique@gmail.com

Paúl Roberto Pino Falconi,

Ingeniero de Industrias Pecuarias,
MA Tecnología de alimentos,
Docente de la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo. Ecuador

Para citar este artículo puede utilizar el siguiente formato:

Sonia Andrea Villamar Manrique y Paúl Roberto Pino Falconi (2018): "Alteraciones del perfil proteico de la leche por la presencia de mycobacterium avium paratuberculosis", Revista Caribeña de Ciencias Sociales (abril 2018). En línea:

[//www.eumed.net/rev/caribe/2018/04/alteraciones-leche-micobacterium.html](http://www.eumed.net/rev/caribe/2018/04/alteraciones-leche-micobacterium.html)

RESUMEN

La paratuberculosis (PTB) es una enfermedad infecciosa de rumiantes causada por Mycobacterium avium spp. paratuberculosis (MAP). En los rodeos lecheros afectados la infección por MAP impacta directa o indirectamente en la productividad debido a la reducción de la cantidad de leche producida y la alteración en la composición láctea.

El presente trabajo tuvo como objetivo identificar las posibles alteraciones en las proteínas del suero de leche de muestras de bovinos infectados con MAP. Se estudió la relación entre las fracciones de proteína sérica y la presencia de anticuerpos específicos anti MAP en suero de leche bovina pertenecientes al banco de muestras de la Cátedra de Inmunología de la FCV-UBA identificadas como positivas o negativas a ADN de MAP a través de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). La composición de la proteína sérica se estudió o evaluó mediante la técnica de electroforesis. Los resultados de los valores de la proteína sérica en presencia de anticuerpos específicos anti MAP disminuyeron en 29% y las fracciones de α -LA y β -LG, disminuyeron en 37, 52 % respectivamente.

Por lo tanto, podemos afirmar que en este trabajo la presencia de anticuerpos anti MAP, tuvo un impacto negativo en la cantidad de proteínas del suero lácteo.

Palabras clave: Paratuberculosis, Calidad láctea, Producción de leche, Proteínas del suero de leche, Electroforesis.

ABSTRACT

Paratuberculosis (PTB) is an infectious disease of ruminants caused by Mycobacterium avium spp. paratuberculosis (MAP). In affected dairy herds, MAP infection directly or indirectly impacts productivity due to the reduction in the amount of milk produced and the alteration in the milk composition.

The objective of this work was to identify the possible alterations in the whey proteins of samples from bovines infected with MAP. The relationship between serum protein fractions and the presence of anti-MAP specific

antibodies in bovine milk serum belonging to the sample bank of the Immunology Chair of the FCV-UBA identified as positive or negative to MAP DNA was studied. the polymerase chain reaction (PCR). The composition of the serum protein was studied or evaluated by the electrophoresis technique. The results of the serum protein values in the presence of anti-MAP specific antibodies decreased by 29% and the α -LA and β -LG fractions decreased by 37, 52% respectively.

Therefore, we can affirm that in this work the presence of anti MAP antibodies, had a negative impact on the amount of whey proteins.

Key words: Paratuberculosis, Milk quality, Milk production, Whey proteins, Electrophoresis.

1.-Introducción

La composición de las proteínas presentes en la leche, está asociada al proceso de secreción láctea (Schanbacher y cols., 1974). Se ha demostrado que se alteran por distintas patologías, como por ejemplo las mastitis registran una elevada concentración de proteínas en el suero sanguíneo, mientras las concentraciones de alfa-lactoalbúmina (α -LA) y beta-lactoglobulina (β -LG) se presentan reducidas (Hogarth y cols., 2004). Los datos de variación de α -LA y β -LG en el suero de leche no están muy estudiados, la influencia del estado de la infección de la glándula mamaria ha sido relacionado con la mastitis clínica y con infecciones experimentales subclínicas (Anderson y Andrews, 1977).

La paratuberculosis (PTB) es una enfermedad crónica intestinal, causada por *Mycobacterium avium* spp. paratuberculosis (MAP), la cual genera un síndrome de mala absorción en el intestino delgado, específicamente en el íleon, donde se produce una atrofia y fusión de las vellosidades ocasionando un cuadro de hipoproteínemia, (Liyang y cols., 2008). Como consecuencia, podríamos suponer que la cantidad de nutrientes que ingresan a la red linfática y capilar estaría disminuida, por lo tanto se realizaría un metabolismo intermedio deficiente, afectando la llegada de aminoácidos circundantes especialmente los esenciales a la glándula mamaria, afectando la síntesis de proteínas propias de la leche como la caseína, alfa-lactoalbúmina (α -LA) y beta-lactoglobulina (β -LG). La composición de la leche en general puede ser afectada por aspectos sanitarios de la vaca, por lo tanto la proporción en la que se encuentran los distintos componentes en la leche no será constante (Alais, 1985,Casado y Garcia, 1985).

1.1.-Composición de la leche

La leche es el producto normal de la secreción de la glándula mamaria, es un alimento nutritivo que está compuesto por caseína, lactosa, grasa y vitaminas. La composición de la leche bovina varía considerablemente según la raza, el estado o momento de lactancia, alimento, entre otros factores.

A pesar de estas variaciones las relaciones entre los componentes suelen ser muy estables por ejemplo la densidad normal varía entre 1,023 a 1,040 (Wattiaux y Armentaño, 2002), pudiendo así detectar algún tipo de adulteración.

La glándula mamaria para producir leche, tiene que llevar a cabo por lo menos tres funciones en su células epiteliales; las cuales son i) obtener energía para realizar su trabajo, donde la mitocondria juega un papel muy importante; ii) elaborar los componentes de la leche que no provienen directamente de la sangre; y iii) regular la cantidad de los diferentes elementos que integran la leche (Bath y cols., 1979). Se considera que pasan por la glándula aproximadamente 500 volúmenes de sangre o 375 volúmenes de plasma por cada volumen de leche que se produce (Bath y cols., 1979).

Se puede decir que en la leche, la proteína está constituida por la caseína, y el plasma por la albúmina y la globulina (Dukes, 1977). En la tabla 1 se encuentra la distribución de componentes (Iturbe, 2012).

Tabla 1. Composición de la leche bovina (agua, grasa, lactosa, minerales y proteína) expresada en gramos por litro (g l⁻¹). Composición de la proteína total tomando en cuenta la caseína y las proteínas del suero. Composición de las proteínas del suero expresadas en gramo por litro (g l⁻¹) en porcentaje

1 Litro de leche	(g l ⁻¹)	%	
Agua	879,00		
Grasas	34,00		
Lactosa	47,00		
Minerales	7,00		
Proteína total	33,00	100,00%	
Caseínas	26,0	79,50%	
Proteínas del suero	6,3	19,30%	100%
Alfa lactoalbúmina	1,9	5,82%	30%
Beta lactoglobulina	3,3	10,11%	52%
Seroalbúmina	0,4	1,23%	
Inmunoglobulinas	0,7	2,14%	

Iturbe (2012)

Las caseínas lácteas son sintetizadas a partir de aminoácidos que son asimilados de la sangre bajo el control del material genético (DNA o ADN). Estas proteínas son envasadas en micelas antes de ser liberadas en el lumen de los alvéolos mamarios (Wattiaux y Armentañó, 2002).

La proteína de la leche de vaca está formada en un 2.7% por caseína y un 0.5% de proteínas del suero. (Valores respecto del total de la composición láctea). La caseína ocupa el primer lugar en cantidad y es importante para la estabilidad de las proteínas en la leche y tiene gran interés para la elaboración de productos derivados. Concretamente, las proteínas del suero suponen alrededor del 20% de las proteínas de la leche bovina (Baro y cols., 2001).

El suero lácteo está compuesto de proteínas importantes en el primer lugar en cuanto a cantidad tenemos a la β -lactoglobulinas (β -LA), en segundo lugar en cantidad en la leche es la α -lactoalbúmina (α -LA) (Tabla 1). Una vez que las caseínas se han retirado de la leche y esta se ha vuelto ácida, la α -lactoalbúmina se puede separar por calentamiento para precipitarlas. El control genético de la leche sintetizada en el alvéolo proviene de la cantidad de la α -lactoalbúmina sintetizada por las células secretoras. Esta proteína es un regulador importante de la cantidad de lactosa y leche que se produce por día (Wattiaux y Armentañó, 2002).

o *Beta-Lactoglobulina (β -LG)*

La β -Lacto globulina (β -LG) representa cerca del 50% de la proteína del suero y el 12% de la proteína total de la leche de los bovinos. En el lacto suero se encuentra en una concentración de alrededor de 3-4 g l⁻¹ (Conrado y cols., 2005).

La β -LG está compuesta de una secuencia 162 residuos de aminoácidos con un peso molecular de 18.4 kDa (Kontopidis y cols., 2004). Debido a su gran valor nutritivo puede ser usada para la fortificación de bebidas y jugos de fruta gracias a su gran solubilidad y estabilidad. (Grasselli y cols., 1997). Últimamente se demostrado que β -LG presenta una mediana capacidad antioxidante respecto a la vitamina E y probucol, lo que incrementa su importancia a nivel nutricional (Lin y cols., 2007).

La β -LG interviene en el metabolismo de los ácidos grasos en las crías facilitando la acción de la enzima lipasas. (Perez y Calvo, 1995). Conjuntamente con su función nutritiva, se ha sugerido que regula el sistema digestivo. Además, cumple una acción antimicrobiana directa (Chaneton y cols., 2008).

o *Alfa-Lactoalbúmina (α -LA)*

Es una calcio metaloproteína que en las células del epitelio mamario forma un complejo con la β -1,4 galactosiltransferasa, para formar la enzima lactosa sintasa, la cual sintetiza lactosa en el interior de la vesícula secretora del aparato de Golgi. La formación de este complejo es necesaria para la síntesis de la lactosa. (Kuhn y cols., 1980) La lactosa es el principal carbohidrato de la leche. La α -LA es osmóticamente activa y regula el volumen de la leche producido. (Konecny y cols., 1994). Posee otros efectos beneficiosos sobre la salud del ternero lactante debido a su elevada proporción de aminoácidos esenciales (triptófano y cisteína). En el lacto suero se encuentra en una concentración de alrededor de 1.5 g l⁻¹ (Conrado y cols., 2005).

o *Inmunoglobulinas*

Las inmunoglobulinas son proteínas que forman parte del sistema de defensa contra microorganismos. La estructura básica, con forma de Y está constituida por dos cadenas ligeras y dos cadenas pesadas (Troncoso, 2014). Unidas por puentes di sulfuros. En el lacto suero se encuentra en una concentración de alrededor de 0.6 - 0.9 g l⁻¹ (Conrado y cols., 2005).

Las inmunoglobulinas (Igs) son sintetizadas por el sistema inmune, y estas proteínas generalmente son extraídas desde la sangre. La permeabilidad de las células secretoras para las Igs es alta durante la síntesis de calostro, pero decrece rápidamente con el comienzo de la lactancia. Estas proteínas portan las propiedades inmunológicas de la leche y protegen a los pequeños mamíferos hasta que su propio sistema inmunológico esté desarrollado (Hermida y cols., 1992). La alteración de las mismas puede indicar del padecimiento por parte del animal (Walstra, 1987).

o Seroalbúmina

La albúmina de la leche es la misma que se encuentra en la sangre, y procede de ella. Es una proteína relativamente grande, con una cadena formada por 528 aminoácidos (Hill y Brew, 1975). En el lacto suero se encuentra en una concentración de alrededor de 0,2-0,6 g l⁻¹ (Conrado y cols., 2005).

La principal proteína del suero de leche es α -LA, juega un papel importante en la síntesis de lactosa en la glándula mamaria, y consecuentemente del incremento en el volumen de la leche producida. La α -LA es generada por las células epiteliales de la glándula mamaria sólo durante la lactación y forma un complejo con la enzima galactosiltransferasa, para formar la lactosa sintetasa, la cual cataliza el último paso de la biosíntesis de la lactosa en la glándula mamaria (Hiraoka y cols., 1980). Durante este proceso, la síntesis de α -LA regula el volumen de la producción de leche. Además α -LA posee un único sitio de unión ente el calcio y la proteína, lo que es muy conveniente para los estudios acerca de los efectos del calcio en la interacción de la proteína con otras proteínas, péptidos, membranas y compuestos orgánicos (Svensson y cols., 1999), actualmente se ha encontrado que algunas formas de α -LA pueden inducir apoptosis en células tumorales, lo que sugiere que esta proteína puede cumplir múltiples funciones biológicas (Whitlock y cols., 2000).

En términos generales en esta investigación se analizó por la técnica de electroforesis el perfil proteico del suero de muestras de leche provenientes de rodeos libres e infectados por MAP y diagnosticados por PCR IS 900 en leche, ELISA (anticuerpos anti-PPA) en suero de sangre y Cultivo de MF.

El objetivo de esta investigación fue identificar alteraciones del perfil proteico en leches de rodeos lecheros comerciales con aislamiento de MAP por PCR y con serología positiva a MAP por la prueba de ELISA-PPA desarrollado con antígeno comercial.

2.- Materiales y Métodos:

2.1.- Origen de las muestras

A partir de cuatro rodeos de la provincia de Buenos Aires. (Partidos de General Pueyrredón, General Viamonte y Lincoln) con un sistema de producción semi extensivo pastoril, se seleccionaron dos establecimientos libres y dos establecimientos infectados por MAP, según los siguientes criterios: libres cuando no presentaron ninguna característica de la enfermedad por los últimos 5 años y arrojaron resultados negativos en los diagnósticos complementarios, e infectados cuando tuvieron antecedentes clínicos de la enfermedad, o con serología positiva y/o aislamiento de MAP.

El total de muestras de leche (20) fueron obtenidas de bovinos en estado de lactación, de raza Holando Argentino, entre 4 y 10 años de edad; 10 de ellas provenientes de rodeos libres de MAP y 10 provenientes de rodeos infectados, sin signos clínicos compatibles con PTB, cursando el estadio I y/o II, se seleccionaron las muestras que cumplieron como requisito la positividad a ELISA en suero sanguíneo, PCR en leche individual y cultivo fecal (Anexo I) (muestras donadas por la Doctora Med. Veterinaria Liliana Gilardoni de su previa investigación, 2016).

2.2.- Acondicionamiento y preparación de las muestras de leche

De cada animal (un cuarto mamario anterior y de uno posterior) se tomaron las muestras de leche (50 ml por extracción manual post lavado de la ubre y despunte) en un recipiente estéril.

2.3.- Descripción de las técnicas usadas

Cada muestra de leche fue centrifugada a 4°C durante 20 minutos (10.000 rpm), y se generó la precipitación de la caseína, por adición de ácido clorhídrico al 10%, a pH 4.6 separando a las proteínas del suero, obteniendo tres fracciones: grasa, suero lácteo y precipitado. Se retiró la capa grasa con la espátula de metal y se procedió a absorber el suero de leche. Este suero fue transferido a tubos cónicos de 15 ml, rotulados con el número de muestra y conservados a -20°C hasta su estudio.

Las muestras del suero de leche fueron procesadas por refractometría, la técnica de electroforesis y la estimación de las fracciones proteica realizada por densitometría.

a) Evaluación de proteínas totales

El valor de la proteína total (g l⁻¹) se obtuvo por refractometría. Para lo cual se colocó el refractómetro frente a una buena fuente de iluminación y una vez comprobado que los prismas estaban perfectamente limpios, con una pipeta Pasteur y sobre la superficie del prisma inferior (en posición horizontal), se colocó 1 o 2 gotas de suero problema, y se cerró el prisma. Se hizo incidir un haz de radiación y se observó por el ocular, con el acromatizador se corrigió la aberración cromática y a continuación se ajustó la medida del índice de refracción.

b) Electroforesis:

Acondicionamiento de la tira:

Las tiras de acetato de celulosa (Cellogel) se conservaron en metanol al 40%, por lo que fue necesario lavarlas primero con abundante agua y antes de sumergirlas en la cuba con el buffer de electroforesis Veronal sódico por 4 minutos. Se escurrió el exceso de buffer, se secaron las tiras con papel absorbente y se colocó la tira sobre el soporte de la cuba, con la superficie opaca hacia arriba, quedando bien fija y plana.

Siembra:

Se colocó con una pipeta 20 μ l de muestra en un portaobjetos, con el sembrador se tomó la muestra y se colocó en la zona cátodo, se aplicó el volumen que carga en el espacio del sembrador. Se dejó secar y se realizó una segunda siembra sobre la sombra de la muestra sembrada anteriormente. La fuente de poder se reguló a 152 voltios por 45 minutos.

Revelado:

Una vez finalizada la corrida, se sumergió la tira 5 minutos en el colorante Amido schwarz o Negro de Amido (Anedra, Research, AG, Argentina) (0,5 g % diluido en metanol, agua, ácido acético proporción 4,5: 4,5: 1). Las tiras luego se decoloraron en solución decolorante (metanol, agua, ácido acético en una proporción 47,5: 47,5: 5), de tal manera que finalmente sólo retuvieron el color las bandas de proteínas.

Posteriormente se procedió a realizar la lectura en el densitómetro (Dynex Technologies, Chantilly, VA, USA) ajustando la cantidad de proteína total para el cálculo de las fracciones proteicas. La figura 1 representa la lectura de las fracciones proteicas.

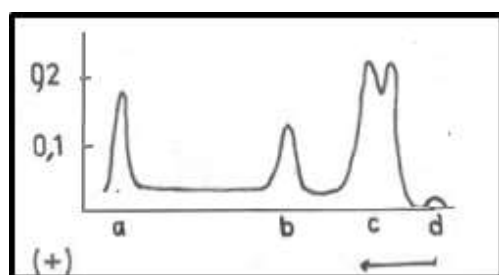


Figura 1. Representación gráfica de la densitometría láctea a: Inmunoglobulinas (Igs), b: α -LA, c: β -LG, d: Seroalbumina (SA)

2.4.- Análisis Estadístico:

Los resultados (concentraciones de Igs, α -LA, β -LG, y seroalbúmina) se analizaron por estadística descriptiva, calculando las medidas de tendencia central (media y mediana) y de dispersión (desviación estándar). En todos los casos se verificó con los supuestos de independencia, normalidad y Homocedasticidad

Las diferencias entre tambos libres o infectados por MAP para cada una de las variables fueron testeadas por un análisis de varianza (ANVA) de acuerdo a un modelo completamente aleatorizado, utilizando el programa Infostat (Versión 2014. Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina). Las diferencias entre medias fueron declaradas significativas para $\alpha = 0,05$.

$$Y_{ij} = \mu + \alpha_i + \epsilon_{ij}$$

Dónde:

Y_{ij} : Variable observada en cada muestra.

μ : Media poblacional de la variable observada estimada por el promedio.

α : Efecto medio poblacional del estado de MAP sobre la variable analizada.

ε_{ij} : término de error aleatorio asociado a la observación Y_{ij} .

3.- Resultados

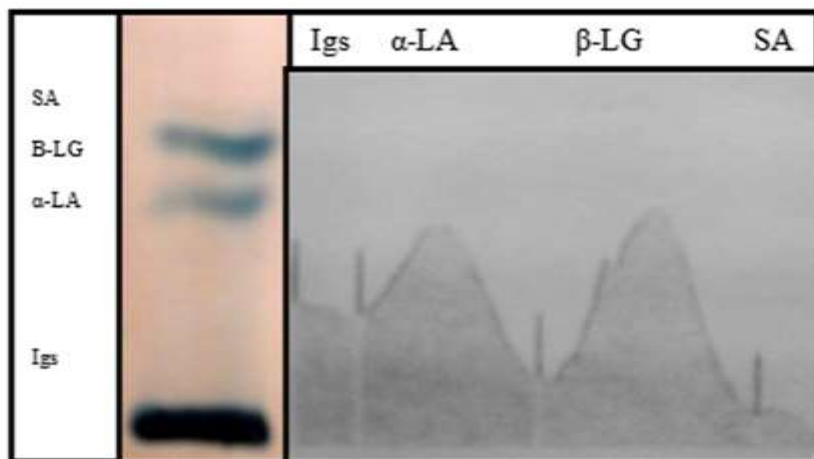


Figura 2: Resultados representativos de la electroforesis y lectura en muestras positivas

Los sueros lácteos fueron estudiados por electroforesis y los resultados medidos por densitometría de forma individual, detectándose diferencias en los patrones electroforéticos entre las muestras de leche provenientes de animales con resultado positivo y negativo a PCR en leche, ELISA en suero sanguíneo y cultivo fecal. La figura 2 muestra resultados representativos observados en las muestras positivas, en los cuales se observa una semejanza entre los niveles de α -LA y β -LG, similitud que difiere del patrón hallado para animales normales, donde la β -LG es aproximadamente el 50% del total de proteína sérica (Figura 3, notar la mayor concentración de β -LG respecto a la de α -LA).

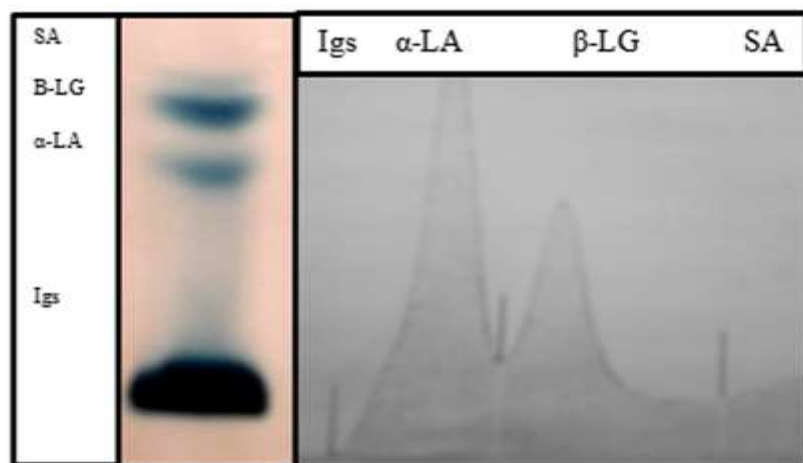


Figura 3: Resultados representativos de la electroforesis y lectura en las muestras negativas

En la tabla 2 tenemos los resultados del diagnóstico de tres pruebas (ELISA, Cultivo y PCR) realizado previamente por la Doctora Gilardoni, cada prueba diagnóstica tiene una sensibilidad y especificidad diferente propia y para cada estadio de la enfermedad.

Tabla 2. Medición de la Proteína sérica total en el suero de leche expresados en gramo por litro (g l^{-1}) de los animales escogidos de establecimientos libres e infectados de MAP, diagnosticados a través de la prueba de ELISA, Cultivo fecal y PCR

Establecimiento	Número de caravana	ELISA	Cultivo	PCR	Proteína Total
E1	5788	+	+	+	1,6
E1	6084	+	-	+	1,4
E1	6616	+	+	+	3,2
E1	6873	S	+	+	4,0
E2	1784	S	+	+	4,2
E2	1595	+	+	+	4,0
E2	2106	+	+	+	4,0
E2	2185	+	+	+	5,4
E2	2390	+	+	+	2,5
E2	1977	S	+	+	4,5
E3	1	-	-	-	4,4
E3	9	-	-	-	4,8
E3	17	-	-	-	4,5
E3	26	-	-	-	7,8
E3	10	-	-	-	5,3
E4	301	-	-	-	5,2
E4	1744	-	-	-	6,6
E4	1512	-	-	-	5,7
E4	2131	-	-	-	6,6
E4	1913	-	-	-	6,8

El resultado del análisis de las muestras individuales de leche mostró que los animales no infectados o clínicamente sanos presentaron mayores concentraciones séricas ($p < 0,05$) en leche de proteínas séricas totales, α -Lactoalbúmina y β -Lactoglobulina (Tabla 3). Por el contrario no se hallaron diferencias ($p > 0,05$) en las concentraciones de Inmunoglobulinas y seroalbúminas.

Tabla 3. Comparación entre las concentraciones de las proteínas séricas presentes en la leche (g l^{-1}) de bovinos MAP positivos y negativos por PCR en leche

	Positivos	Negativos	EEM ¹	P-valor
Proteína sérica	3,48	5,77	0,38	0,005
Inmunoglobulinas	0,53	0,60	0,12	0,656
α -Lactoalbúmina	1,05	1,66	0,13	0,006
β -Lactoglobulina	1,77	3,40	0,30	0,001
Seroalbúmina	0,16	0,20	0,06	0,437

¹ Error estándar de la media

4.-Discusión

El objetivo central de este capítulo fue identificar alteraciones del perfil proteico en muestras de leche provenientes de rodeos comerciales con aislamiento positivo de MAP. Los resultados obtenidos permiten afirmar que el estado de infección modifica la composición proteica del suero lácteo.

La prueba de ELISA indirecta en leche tiene una sensibilidad y especificidad de 36% y 87% respectivamente (Buergelt y Williams, 2004; Badi y cols., 2010). Los animales en estadios tempranos, con baja y/o intermitente excreción de MAP, generalmente no producen niveles detectables de anticuerpos (OIE, 2008). Así es como

la no detección de anticuerpos séricos no implica la ausencia de excreción de MAP por leche y/o MF (Buergelt y Williams, 2004; Badi y cols., 2010).

Evidentemente la infección de PTB tiene un impacto negativo sobre a la proteína sérica aún en animales subclínicos en los cuales la bacteria comienza a colonizar y lesionar las placas de Peyer en el intestino delgado (íleon) formando granulomas difusos, ocasionando una absorción deficiente de aminoácidos, (Bortree y cols., 1962) y por lo tanto una captación menor por la glándula mamaria, disminuyendo la capacidad de síntesis de estas proteínas séricas.

La α -LA y β -LG han sido ampliamente estudiados como biomarcadores de la función de la glándula mamaria (31,32,33,34,35). En el caso de la mastitis (2) detectaron un aumento de la concentración de las proteínas totales (PT) en el suero sanguíneo, mientras concentraciones de α -LA, y β -LG se redujeron en el suero lácteo. Sin embargo, Caffin y Poutrel (Caffin y Poutrel, 1985) sólo identificaron la disminución de la concentración de α -LA en las muestras provenientes de leches mastíticas por coliformes. Según nuestro conocimiento estas alteraciones no han sido descritas para las leches provenientes de animales infectados por MAP.

La influencia del estado de la infección de mastitis clínica por *Streptococcus agalactiae* así como también por infección experimental, fue relacionada con la disminución de α -LA y β -LG, mientras que la seroalbúmina y las Igs aumentaron.

La concentración de proteína sérica láctea encontrada en este trabajo para los animales no infectados (MAP negativos) (5,77 g l-1) es coincidente con la reportada por Alais, en 1985(5) (5,40 g l-1) y Abd y cols. en el 2009(Bergara y cols., 1998) (6,0 g l-1). Por el contrario, para los animales MAP positivos se detectó una disminución en la concentración de proteína sérica láctea del 40% (promedio: 3.48 g l-1). En otras investigaciones realizadas con suero sanguíneo se observa una disminución de proteína sérica sanguínea con la presencia de MAP (Fernandez y cols, 2010, Meza-Nieto y cols., 2006).

Las concentraciones normales de β -LG en los rodeos PCR negativos fueron de 3,40 g l-1 y se ubicaron dentro del rango considerado normal según diversos autores (3 – 4 g l-1; (Conrado y cols., 2005)5; 2,5-4,0 g l-1;(Kiddy y cols., 1968)), mientras que para los animales positivos se observó una disminución del 52%.

De igual manera, el promedio de la concentración normal de α -LA fue de 1,66 g l-1 resultado que coincide con lo reportado por Iturbe (2012, 1,2-1,5 g l-1) (Iturbe, 2012), mientras que los animales positivos presentaron una disminución del 37%.

Los resultados de Igs (0,60 \pm 0,42 g l-1) y seroalbúmina (0,20 \pm 0,23 g l-1) hallados en este trabajo se encontraron dentro de los rangos normales según Iturbe (2012, 0,50-0,70 y 0,20-0,25 g l-1 respectivamente) (Iturbe, 2012).

La concentración de seroalbúmina en el suero de leche no resultó diferente entre animales infectados y libres de MAP. Una posible causa, podría ser debido a que esta fracción proteica no es sintetizada por las células epiteliales de la glándula mamaria, sino que son absorbidas desde la sangre y de ella depende la presión osmótica del suero.

También, es razonable especular que al provenir las muestras de animales en estadio subclínico, este parámetro fisiológico no se hubiera visto aún afectado por la patología. Algo similar ocurrió con la concentración de las inmunoglobulinas (Igs), que pese a verse reducida en los animales MAP positivos (20%), no se detectaron diferencias estadísticas significativas. La mayoría de Igs se producen a nivel sistémico pero hay un porcentaje de síntesis local proveniente del sistema inmune de mucosas representado por linfocitos B del tejido mamario. Estas células plasmáticas (productoras de Igs) proveen a la glándula mamaria una inmunidad local y la cantidad elevada presente en el suero puede deberse a una respuesta inmune a la presencia de enfermedades concomitantes (Meza-Nieto y cols., 2006).

Por otro lado, es posible especular que considerando la variabilidad propia de este tipo de respuesta inmune de existir el efecto de la enfermedad sobre las concentraciones de Igs y seroalbúminas, simplemente no haya sido posible detectarse debido al escaso número de animales empleados.

5.- Conclusiones

Se lograron identificar las alteraciones del perfil proteico en las muestras de leche con aislamiento de MAP por PCR y con serología positiva a MAP por la prueba de ELISA (anticuerpos anti-PPA).

Se puede afirmar que: existe una relación entre la presencia de anticuerpos específicos a *Mycobacterium avium* spp. Paratuberculosis en las muestras de leche y la disminución de la concentración de las fracciones de proteína del suero de leche, siendo las más afectadas las α -LA, β -LG en comparación con el resto de las proteínas del suero de leche.

Referencias

1. ABD, E.S., SAFINAZ, E.S., Y AIDA, S. (2009). Factors affecting the functional properties of whey protein products a review. *Food Rev Internat*, 25(3), 251-270. Recuperado de https://cdn.shopify.com/s/files/1/0152/2477/files/Whey_Protein_3.pdf
2. ALAIS, CH. (1985). Principios de técnica lechera. *Ciencia de la leche* (pp. 873) Barcelona: Reverté. Recuperado de http://books.google.com.ar/books/about/Ciencia_de_la_leche.html?id=bW_ULacGBZMC
3. ANDERSON, M., Y ANDREWS, A. (1977). Progressive changes in individual milk protein concentrations associated with high somatic cell counts. *Journal Dairy Res*, (44), 223. Recuperado de <http://journals.cambridge.org/action/displayAbstract?fromPage=online&aid=5154084#>
4. BADI, F.A., AL HAROON, A., ALLUWAIMI, A. (2010). The gamma delta cells as marker of non-seroconverted cattle naturally infected with *Mycobacterium avium* subspecies paratuberculosis. *Research in Veterinary Science*, 88(1), 72-76. Recuperado de <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0034528809001519>
5. BARO, T., JIMÉNEZ, J., MARTÍNEZ, A., Y BOUZA. (2001). *Ubre de una vaca lechera, péptidos y proteínas de la leche con propiedades funcionales*. Universidad de Granada, España.
6. BATH, D. L., DICKINSON, F., TUCKER, H., Y APLEMAN, R. (1979). *Dairy cattle principles, practices, problems, profits*. Philadelphia, USA.
7. BEGARA-MCGORUM, I., WILDBLOOD, L.A., CLARKE, C.J., CONNOR, K.M., STEVENSON, K., MCINNES, C.J., SHARP, J.M., Y JONES, D.G. (1998). Early immunopathological events in experimental ovine paratuberculosis. *Vet. Immunol.Immunopathol.* 63, 265-287. Recuperado de <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S016524279800107X>
8. BORTREE, A.L., CARROLL, E., Y SCHALM, O. (1962). Whey protein pattern of milk from cows with experimentally produced mastitis. *Journal of Dairy Science.* (45)1465. Recuperado de <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S002203026289657X>
9. BUERGELT, C.D., Y WILLIAMS, J.E. (2004). Nested PCR on blood and milk for the detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* DNA in clinical and subclinical bovine paratuberculosis. *Aust. Vet. J.* 82(8), 497-503. Recuperado de <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1751-0813.2004.tb11169.x/full>
10. CAFFIN, J.P., Y POUTREL, B. (1985). Physiological and Pathological Factors Influencing Bovine α -Lactalbumin and β -Lactoglobulin Concentrations in Milk. Institut National de la Recherche Agronomique (INRA) Station de Pathologie de la Reproduction, Nouzilly, France.
11. CASADO, P., Y GARCÍA, J.A. (1985). La calidad de la leche y los factores que la influncian. *Industrias Lácteas Españolas*, (81), 298.
12. CHANETON, L., TIRANTE, L., MAITO, J., CHAVES, J., Y BUSSMANN, L.E. (2008). Relationship between milk lactoferrin and etiological agent in the mastitic bovine mammary gland. *Journal of Dairy Science*, 91(5), 1865-1873. Bawden y Nicholas, 1999
13. CONRADO, L., VEREDAS, V., NÓBREGA, E., Y SANTANA, C. (2005). Concentration of Alpha-lactalbumin from cow milk whey through expanded bed adsorption using a hydrophobic resin. *Braz. J. Chem. Eng.* 22(4). Recuperado de http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0104-66322005000400002
14. DUKES, H. (1977). Fisiología de los animales domesticos. New York, USA: Cornell University.
15. FERNÁNDEZ, B., GILARDONI, L.R., JOLLY, A., COLAVECCHIA, S.B., PAOLICCHI, F.A., Y MUNDO S.L. (2012). Detection of Bovine IgG Isotypes in a PPA-ELISA for John's Disease Diagnosis in Infected Herds. *Veterinary Medicine International*, 2042-2048. Recuperado de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3390138/pdf/VMI2012-145318.pdf>

16. GRASSELLI M.; DEL CAÑIZO A.; FERNÁNDEZ H.; MIRANDA M.; CAMPERI S., Y CASCONO O. (1997). ¿Qué hacer con el suero del queso?. *Ciencia Hoy*, (8), 43.
17. HARMON, R.J., SCHANBACHER, F.L., FERGUSON, L.C., Y SMITH, K.L. (1975). Concentration in lactoferrin in milk normal lactating cows and changes occurring during mastitis. *Am. J. Vet. Res.*, (36)1001. Recuperado de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1096690>
18. HERMIDA, A., LOPEZ, P., PASIRO, P., RODRIGUES, J., Y SINAL, J. (1992). Fracciones proteicas de la leche. *Anales de Bromatología*, Galicia: Universidad de Santiago de Compostela.
19. HILL, R.L., Y BREW, K. (1975). Lactose synthetase. *Adv. enzymol. relat. areas mol. Biol.*, 43, 411-490.
20. HIRAOKA, Y., SEGAWA, T., KUWAJIMA, K., SUGAI, S., Y MURAI, N. (1980). α -Lactalbumin: A calcium metalloprotein. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 95, 1098–1104. Recuperado de <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0006291X80915855>
21. HOGARTH, C.J., FITZPATRICK, J.L., NOLAN, A.M., YOUNG, F.J., PITT, A., Y ECKERSALL, P.D. (2004). Differential protein composition of bovine whey a comparison of whey from healthy animals and from those with clinical mastitis. *Proteomics*, 4, 2094. Recuperado de <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/pmic.200300723/pdf>
22. ITURBE, F. (2012). *Análisis de productos lácteos*. México: Universidad Nacional Autónoma de México.
23. KIDDY, C.A., GROVES, M.L., MCCANN, R.E., Y TREECE, J.M. (1968). Effect of udder inflammation on electrophoresis pattern of cow's milk proteins. *Journal of Dairy Science*, 51, 954.
24. KONECNY, P., BROWN, P, Y SCOUTEN, W. (1994). Chromatographic purification of immunoglobulin G from bovine milk whey. *Journal of Chromatography A*, 673, 45-53. Recuperado de <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/002196739487056X>
25. KONTOPIDIS, G.; HOLT, C.; Y SAWYER, L. (2004). Invited review: betalactoglobulin: binding properties, structure and function. *Journal of Dairy Science*, 87, 785-796. Recuperado de [http://www.journalofdairyscience.org/article/S0022-0302\(04\)73222-1/pdf](http://www.journalofdairyscience.org/article/S0022-0302(04)73222-1/pdf)
26. KUHN, N.J., CARRICK, D.T., Y WILDE, C.J. (1980). Lactose synthesis: the possibilities of regulation. *Journal of Dairy Science*, 63(2), 328-336. Recuperado de [http://www.journalofdairyscience.org/article/S0022-0302\(80\)82934-1/pdf](http://www.journalofdairyscience.org/article/S0022-0302(80)82934-1/pdf)
27. LIN H, C., CHEN W, L., Y MAO S, J.T. (2007). Antioxidant Nature of Bovine Milk β -Lactoglobulin. *Journal of Dairy Science*, 90, 547–555. Recuperado de [http://www.journalofdairyscience.org/article/S0022-0302\(07\)71538-2/pdf](http://www.journalofdairyscience.org/article/S0022-0302(07)71538-2/pdf).
28. LIYING, L., BRANDON, L., PLATTNER, A., Y HOSTETTER, M. (2008). Live *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis and a Killed-Bacterium Vaccine Induce Distinct Subcutaneous Granulomas, with Unique Cellular and Cytokine Profiles. *Clinical and vaccine immunology*, 15(5), 783–793. Recuperado de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2394839/pdf/0480-07.pdf>.
29. MEZA-NIETO, M.A., VALLEJO-CORDOBA, B., GONZÁLEZ-CÓRDOVA, A.F., FÉLIX, L., Y GOYCOOLEA, F.M. (2006). Effect of β -Lactoglobulin A and B Whey Protein Variants on the Rennet-Induced Gelation of Skim Milk Gels in a Model Reconstituted Skim Milk System. *Journal of Dairy Science*, 90, 582–593. Recuperado de [http://www.journalofdairyscience.org/article/S0022-0302\(07\)71541-2/pdf](http://www.journalofdairyscience.org/article/S0022-0302(07)71541-2/pdf).
30. OIE (2008). *Manual de Pruebas de Diagnóstico y Vacunas para los Animales Terrestres*. Recuperado de <http://www.oie.int/eng/normes/mmanual/2008/pdf/2.01.11-PARATB.pdf>.
31. PÉREZ, M.D., Y CALVO, M. (1995). Interaction of beta-lactoglobulin with retinol and fatty acids and its role as a possible biological function for this protein: a review. *Journal of Dairy Science*, 78(5), 978-988. Recuperado de [http://www.journalofdairyscience.org/article/S0022-0302\(95\)76713-3/pdf](http://www.journalofdairyscience.org/article/S0022-0302(95)76713-3/pdf)
32. RANDOLPH, H.E., ERWIN, R., Y RICHTER, R. (1969). Influence of mastitis on properties of milk. *Journal of Dairy Science*, 52, 15. [http://www.journalofdairyscience.org/article/S0022-0302\(69\)86794-9/pdf](http://www.journalofdairyscience.org/article/S0022-0302(69)86794-9/pdf)
33. SCHANBACHER, F.L., Y LARRY SMITH, K. (1974). Formation and role of unusual whey proteins and enzymes: relation to mammary function. *Journal of Dairy Science*, 57(7), 1048-1062. Recuperado de [http://www.journalofdairyscience.org/article/S0022-0302\(75\)84678-9/pdf](http://www.journalofdairyscience.org/article/S0022-0302(75)84678-9/pdf)

34. SINHA, D.P., Y MIKOLAJCIK, M. (1974). Quantitation of selected whey proteins of mastiffs and normal milk by immunodiffusion. *Journal of Dairy Science*, 57, 600. Recuperado de [http://www.journalofdairyscience.org/article/S0022-0302\(77\)83926-X/pdf](http://www.journalofdairyscience.org/article/S0022-0302(77)83926-X/pdf)
35. SVENSSON, M.H., SABHARWAL, A., HAKANSSON, A.K., MOSSBERG, P., LIPNIUNAS, H., LEFFLER, C., SVANBORG, S., Y LINSE, J. (1999). Molecular characterization of alpha-lactalbumin folding variants That induces apoptosis in tumor cells. *Biol. Chem.*, 274, 6388–6396. Recuperado de <http://www.jbc.org/content/274/10/6388.long>
36. TRONCOSO, H. (2014). Producción de leche y biosíntesis. Entorno Ganadero. (pp. 44), México: Universidad Autónoma de México.
37. WALSTRA, P., Y JENNE, R. (1987). Química y Física Lactológica. Zaragoza, España: Ed. Acribia.
38. WATTIAUX, M., Y ARMENTAÑO, L. (2002). Esenciales lecheras. Composición de la leche y valor nutricional. Wisconsin: Instituto Babcock para la investigación internacional de la industria lechera.
39. WHITLOCK, R.H., WELLS, S.J., SWEENEY, R.W., Y TIEM, J. (2000). ELISA and fecal culture for paratuberculosis (Johne's disease): sensitivity and specificity of each method. *Vet. Microbiol.*, 77, 387–398. Recuperado de <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378113500003242>