

XXI Congreso Panamericano de Ciencias Veterinarias.
12 a 16 de octubre, Guadalajara, México. Páginas 37 – 43.

Aplicación de métodos de diagnóstico y control de Paratuberculosis en Argentina.

Claudia Morsella y Fernando Paolicchi
Laboratorio de Bacteriología, EEA INTA,
CC 276, (7620) Balcarce, Argentina

La Paratuberculosis (PTBC) es una enfermedad crónica de los rumiantes producida por *Mycobacterium avium* subsp *paratuberculosis*, que afecta a bovinos, ovinos y otros rumiantes menores, provocando enteritis crónica y pérdidas de producción por deficiente conversión alimenticia. La enfermedad también ha sido diagnosticada en primates, ciervos, conejos, zorros y camélidos, además de una diversa población de animales silvestres. Actualmente es asociada a la Enfermedad de Crohn en los humanos por lo cual podría ser considerada una potencial enfermedad zoonótica.

El agente etiológico de la PTBC fue considerado como una micobacteria de tipo aviar por Johne y Frothingham en 1895, cuando se realizó la primera descripción de la enfermedad. En 1990 durante una nueva revisión del complejo *M.avium* se propuso la denominación de *M.avium* subsp *paratuberculosis*, subespecie conocida en su forma abreviada como Map.

La PTBC es reconocida como una importante enfermedad emergente en muchos países y ha sido denunciada aproximadamente en 60 países de los cuales en el 30% de ellos la enfermedad ha sido introducida por bovinos u ovinos importados. La prevalencia de PTBC se incrementa principalmente en ganado lechero, en ovinos y en ciervos. En Sudamérica, Argentina es pionera en estudios sobre esta enfermedad y ha sido diagnosticada en varias especies animales.

La PTBC es una de las enfermedades infecciosas más frecuentes del ganado lechero y de carne, tanto de la Argentina como de otros países donde la ganadería es una actividad relevante. En el año 1963 la F.A.O. concluyó que era una de las enfermedades que más seriamente afectaba a la "industria ganadera bovina" y actualmente es motivo de intensos programas sanitarios de control en Europa, Estados Unidos y Australia.

La prevalencia de PTBC en Europa oscila entre un 7% y un 55%, en los Estados Unidos un 40% de los rodeos de más de 300 cabezas están infectados (entre 11% y 18% de portadores subclínicos) y en Australia la prevalencia en rodeos lecheros se encuentra entre un 9% y un 22%. En 1984, las pérdidas anuales ocasionadas por la infección con Map en los Estados Unidos fueron estimadas en 1.500 millones de U\$S y recientes estudios calculan pérdidas entre 200 y 250 millones de U\$S por año en la industria láctea. Se ha calculado que cuando la prevalencia en un rodeo con enfermedad es igual o mayor al 10%, el costo promedio de las pérdidas alcanzaría los 200 U\$S/vaca. Por este

motivo el control de la enfermedad se considerada de alta prioridad, para lo cual la aplicación de planes de control estatal es considerada estrategica en paises desarrollados.

La enfermedad causa pérdidas económicas a los productores y a la industria láctea y cárnica, cuando se revela la enfermedad clínica pero tambien con la presencia de animales portadores sub-clínicos de PTBC. Estos ultimos aparentan estar libres de la enfermedad pero son portadores de *Map*, la eliminan en forma intermitente aumentando la contaminacion del suelo y un porcentaje termina manifestando la enfermedad.

Las pérdidas directas por PTBC son: a) disminución en la producción de carne y/ó leche, b) disminución de la fertilidad, con un incremento del intervalo entre partos, c) prematura eliminación de los animales del rodeo, d) pobre conversión alimenticia, e) aumento de la susceptibilidad a otras enfermedades infecciosas (se estima entre 4 a 7 veces mayor presentación de mastitis respecto de los no infectados), f) pérdida en el potencial genético y en mercados de exportación y, g) un incremento en los costos derivados del uso de medicamentos.

La infección ocurre principalmente en animales jóvenes (terneros, corderos, bambis) por la vía fecal-oral, aunque también se ha demostrado la vía intra-uterina. Los terneros nacidos de vacas portadoras del *Map* tienen mayor probabilidad de estar infectados que aquellos nacidos de vacas no infectadas. La probabilidad de infección disminuye a medida que la edad progresa, siendo los adultos menos susceptibles, aunque no exentos de contagio, dependiendo de la carga bacteriana a la que estén expuestos. En vacas lecheras existen algunos factores asociados con el riesgo de introducir PTBC en un establecimiento: introducción de nuevos animales, sitio de reunión habitual de los mismos, densidad poblacional alta, falta de remoción de materia fecal y deficiente lavado de las ubres previo al parto.

La Argentina no cuenta con una caracterización epidemiológica global de PTBC, pero tampoco existen datos concretos en Sudamérica. La información regional de Argentina indica una seroprevalencia entre el 7,2% y 19,6% en rodeos bovinos de cría de la Cuenca del Rio Salado (Provincia de Buenos Aires). Por otro lado, el diagnóstico clínico se ha incrementado entre un 5% y 10%, siendo los valores previos menores del 3% y observando cambios en el comportamiento de la enfermedad, ya que la presentación clínica es cada vez mas frecuente en bovinos jóvenes (12 a 18 meses de edad), incorporándose de esta forma a la invernada como otra categoría de riesgo.

Estudios previos en nuestro pais estimaron una disminución en la producción de carne y/ó leche que alcanzaría hasta un 19%. Según los datos de seroprevalencia de PTBC, la estimación preliminar de las pérdidas económicas referentes al valor bruto de la producción ganadera y de la comercialización y flete, durante el año 2007 se produjeron pérdidas aproximadas de 22.0 millones de U\$S (zona de cría bovina Cuenca del Rio Salado) y de 6.3 millones de U\$S (Cuencas Lecheras) en la Provincia de Buenos Aires.

La PTBC en bovinos es una enfermedad infecciosa de lento progreso, requiriendo un considerable número de años desde que se instala en el rodeo hasta que se observan animales con signos clínicos. En rodeos bovinos cerrados y con infección hay un incremento constante en el porcentaje de animales infectados con *Map*, mientras que en rodeos abiertos sanos se corre el riesgo de incorporar animales infectados si no se realiza el diagnóstico previo al ingreso al establecimiento.

Si en un rodeo bovino se observan animales con diarrea intermitente, pérdida de peso, edema submandibular y desmejoramiento del estado corporal, entonces existen razones para pensar de que PTBC puede ser la causa y estar oculto un número importante de animales con infección. La observación de casos clínicos de PTBC en determinados momentos productivos (parto) o estacionales (déficit de alimento), solo representa la parte visible del problema, ya que habrá una proporción mayor del rodeo infectado que son portadores subclínicos de la enfermedad. La PTBC se caracteriza macroscópicamente por una enteritis crónica que produce diarrea y resulta en un proceso de enflaquecimiento y desmejoramiento progresivo por mala absorción y pobre conversión alimenticia, que conduce eventualmente a la muerte del animal enfermo. En un rodeo infectado los animales podrían ser clasificados en cuatro estados: -estado 4: infectados y clínicamente enfermos, -estado 3: infectados asintomáticos, -estado 2: infectados no identificados por las técnicas diagnósticas (falsos negativos), -estado 1: no infectados (sanos).

Para el estadio clínico de PTBC no existen tratamientos, quedando como único recurso la confirmación con un diagnóstico rápido y la eliminación del animal. En general la enfermedad se presenta en animales adultos o en vaquillas de primer o segundo servicio, después del parto y en ovinos adultos mayores de 12 meses. En los ciervos además de la presentación en animales adultos, es frecuente observar la enfermedad en animales jóvenes de 12 a 15 meses de edad, con alta susceptibilidad a la infección y un grado de expresión de la enfermedad muy repentino.

M.paratuberculosis se caracteriza por su ácido-alcohol resistencia, alto contenido de ácidos micólicos (60 y 90 carbonos) y 69.3% de G+C (guanina-citosina) en su ADN. Son bacilos rectos, cortos de 1-10 micras por 0,2-0,6 micras, aerobios, de lento crecimiento y presentan para su aislamiento primaria dependencia de micobactina (compuesto quelante del hierro) en medios con huevo. Presenta un grado de homología genotípica mayor al 95% con *M.avium* subsp *avium* y alrededor de 8 patrones de restricción de diferencia entre ellos. El genoma de *Map* ha sido recientemente definido con la cepa K-10 y consiste en una hebra cromosomal circular simple de 4,83 pares de bases y contienen alrededor de 400 *open reading frame* (ORF). Una característica diferencial dentro de la clasificación de las micobacterias es la presencia de un segmento de inserción específico dentro del genoma denominado IS900, que sirve de base para su clasificación por pruebas de PCR.

Las características del desarrollo diferencial entre cepas de *Map* aisladas con relativa facilidad de los bovinos de aquellas aisladas con mayor dificultad de los ovinos, ha hecho que se considerasen dos posibles tipos

variables de *Map*, la variedad bovina y la variedad ovina. En ciertos casos la dificultad para cultivar *Map* desde animales con lesiones podría deberse a la presencia de formas morfológicas (redondeadas) y metabólicas diferentes de las clásicas, denominadas formas deficientes de pared celular (esferoplastos) y de frecuente asociación con la forma patológica encontrada en casos de Enfermedad de Crohn en humanos.

Para el diagnóstico de laboratorio en la práctica se disponen de métodos básicos y métodos de biología molecular como: a) inmunidad humoral o serológicos, por detección de anticuerpos humorales por ELISA o inmunodifusión (IDA), b) bacteriológicos, por tinción con Ziehl Neelsen y cultivo de la muestra clínica en medios específicos, c) inmunidad celular, detección de gamma interferón en plasma, d) moleculares, PCR y Epidemiología Molecular y e) histopatológico. Los métodos descritos aquí son aplicados en Argentina para diagnóstico de rutina e investigación diagnóstica

Pruebas Serológicas: se aplica en bovinos adultos desde una edad aproximada de 3 años. La mayor la certeza del diagnóstico serológico se presenta cuando el animal manifiesta signos clínicos como diarrea y edema submandibular. Generalmente existe una correlación positiva entre la detección del mayor título serológico en ELISA y mayor excreción del bacilo por materia fecal. ELISA es la prueba más utilizada en el mundo con una especificidad cercana al 90% y una sensibilidad que en términos generales es del orden del 55 al 65%, pero aumenta con los casos clínicos hasta más de 90%.

Para la detección de PTBC en ovinos tanto ELISA e IDA son valiosos y ambos detectan diferentes subpoblaciones de ovejas infectadas, observándose una mayor sensibilidad con ELISA (98,2-99,5% especificidad y 35-54% sensibilidad). En Argentina el uso de ELISA indirecto en poblaciones de cervidos infectados con *Map* ha contribuido a disminuir la prevalencia desde el 18,9% hasta el 2,4% con la aplicación anual del sangrado y eliminación de positivos durante un total de 6 años.

-Pruebas Bacteriológicas.

Tinción con Ziehl Neelsen: La observación microscópica de un frotis de materia fecal, tiene sensibilidad y especificidad bajas para incluirlas dentro del diagnóstico como única alternativa. Sin embargo, siempre debe ser utilizada para estimar la presencia de micobacterias. Por el contrario, la tinción de improntas realizadas a partir de los tejidos afectados con lesiones macroscópicas, es de utilidad en casos de paratuberculosis ya que las micobacterias son claramente visibles dentro de los macrófagos residentes en la lesión. Solo es considerado positivo cuando se observan bacilos fuertemente coloreados y agrupados en nidos conteniendo aproximadamente entre 10 y 20 células bacterianas.

Cultivo: El diagnóstico denominado "*Gold Standard*" (Prueba de Oro) es el cultivo y aislamiento de *Map* a partir de muestras de materia fecal, leche, semen o tejidos afectados. El cultivo de la bacteria es difícil, ya que su lento desarrollo (entre 30 y 120 días) se realiza sobre medios especiales con agregado de compuestos indispensables para su desarrollo, generalmente adicionados con antibióticos. Las colonias puntiformes blanquecinas, su

crecimiento lento y la dependencia a la micobactina “J” usada como cofactor de crecimiento exclusivo en *Map* en medios de cultivo solido como el Herrold, son indicadores de su presencia.

El cultivo en medio Herrold debe adicionarse con piruvato y antibioticos para mejorar el crecimiento de la micobacteria e inhibir el desarrollo de contaminantes, respectivamente. Otros medios de cultivo utilizados son el Lowenstein-Jensen, Middlebrook solido o líquido enriquecidos o el de Watson-Reid. A pesar de la importancia del cultivo, no existe estandarizacion de los métodos utilizados mundialmente y los laboratorios varian en su capacidad para la detección de *Map*.

Existen alternativas al cultivo individual, realizando “*pooles*” de materia fecal de 5-6 bovinos, donde se reduce sustancialmente el costo de un monocultivo. El cultivo debería ser usado para confirmar la infección en animales con resultados positivos en ELISA en las siguientes circunstancias: a) ninguna evidencia clínica, b) costo muy alto de eliminar un animal positivo y, d) inserción de un establecimiento en un programa de control voluntario de PTBC.

-Pruebas de Inmunidad celular: Detección del Gamma Interferón: es una prueba que detecta infección temprana ya que identifica una citoquina liberada por los linfocitos en el plasma sanguíneo, luego de incubarlos con el antígeno específico. La prueba es útil sobre bovinos jóvenes recientemente infectados y que aún no han desarrollado anticuerpos séricos dependientes de linfocitos B. La interpretación de un animal positivo dentro del rodeo utilizando la prueba del gamma interferon no es sencilla, ya que la interpretación se debe realizar paralelamente junto al diagnóstico de tuberculosis y por lo tanto diferenciar al mismo tiempo ambas respuestas en la misma prueba.

-Pruebas de Biología y Epidemiología Molecular: *Map* constituye un grupo homogéneo de micobacterias que no son posibles de diferenciar claramente por métodos bioquímicos, serológicos u otros métodos convencionales. De esta forma los métodos moleculares son de mucha utilidad para estudios epidemiológicos de esta especie. Un análisis de la diversidad molecular de las cepas de *Map* aisladas de diversos animales y humanos ayuda a establecer el grado de heterogeneidad en cepas aisladas en una variedad de hospedadores susceptibles a esta micobacteria.

Cepas compartidas entre diferentes hospedadores (bovinos, ciervos, ovinos, humanos) reflejarían un alto grado de transmisión entre especies. Para una precisa identificación y estudios epidemiológicos de *Map*, se utiliza la técnica de RFLP (polimorfismo en la longitud de los fragmentos de restricción) con la secuencia de inserción IS900, específica de *Map* como marcador genético. Esta secuencia de inserción, presente en 15 a 20 copias en el genoma de *Map*, fue utilizada para diferenciar aislamientos de bovinos y ciervos en Argentina. En este estudio epidemiológico, el RFLP-IS900 mostró que cepas idénticas infectan bovinos y ciervos y que los genotipos encontrados en Argentina, un 75% de ellos de idéntico patrón, fueron diferentes a los presentes en otros países. La técnica de RFLP es sólo aplicable a cepas cultivadas.

Métodos basados en PCR (reacción en cadena de la polimerasa) permiten identificar y a la vez caracterizar *Map* aislados de diferentes hospedadores, incluso sin la necesidad de observar las colonias desarrolladas en el cultivo. La técnica de PCR utilizando como blanco de los primers al IS900, permite una rápida detección de pocas bacterias presentes en diferentes muestras clínicas tales como materia fecal, sangre, leche, tejidos y biopsias. A pesar de su especificidad, esta técnica no permite diferenciar entre aislamientos de *Map*. Otro elemento de inserción denominado IS1311, ha sido descrito en el cromosoma de *Map*, aunque este elemento de inserción no es único de estas cepas ya que también se encuentra en *M.avium* y *M.intracellulare*. El análisis de la secuencia IS1311 en *Map* de origen bovino mostró que contiene una mutación puntual adicional, que puede ser utilizada para distinguirlas de las cepas ovinas. Por otro lado, MIRU (unidades repetitivas micobacterianas) y VNTR (numero variable de secuencias en tandem) se encuentran distribuidas en el genoma de *Map* como simple copia o como múltiples repeticiones. Algunos de estos *loci* contienen variaciones en el número de repeticiones entre los aislamientos de *Map*.

En un estudio reciente fueron encontrados 44 *loci* VNTR-MIRU en su genoma, identificando polimorfismo en algunas de estas secuencias entre distintos aislamientos de *Map* y entre esta micobacteria y otras estrechamente relacionadas como *M. avium*, demostrando que pueden utilizarse para genotipificar *Map* y distinguir especies dentro del complejo avium. La certidumbre del diagnóstico dependerá no solo de la sensibilidad y especificidad de cada técnica sino de la etapa evolutiva en que se encuentren las lesiones y del tipo predominante de respuesta inmune en el momento de la toma de muestras.

-Técnicas Histopatológicas: en tinciones de rutina con hematoxilina y eosina se observa una enteritis granulomatosa de variable intensidad ubicada en los últimos tramos del intestino delgado, primeros de grueso y linfonódulos y linfáticos adyacentes. La tinción con Ziehl Neelsen es de mucha utilidad en tejidos y como técnica de mayor sensibilidad confirmatoria la inmunohistoquímica con antisueros anti-*Map* es altamente recomendable.

- Separacion Inmunomagnética de Map: La utilización de la separación inmunomagnética (IMB) mediante sueros específicos anti-*Map* permiten la concentración de *Map* en solución. En Argentina estamos utilizando la separación inmunomagnética para aislamiento en leche usando anticuerpos (Ac) policlonales específicos anti-*Map*. Perlas inmunomagnéticas comerciales (Goat Anti-Mouse IgG Magnetic Beads, New England BioLabs, Inc.), adheridas a sueros policlonales anti-*Map* forman el complejo: IMB-Ac anti-*Map*. Mediante una gradilla magnética se realiza la inmunoseparación obteniéndose dos fracciones: a) sobrenadante (*Map* no adheridos a las IMB y otros componentes de la solución) y b) sedimento: *Map* adherido a IMB-Ac. Se ha observado que la adherencia bacteriana del complejo IMB-Ac anti-*Map* fue de 10^3 UFC/ml, mientras que la de complejos sin anticuerpo resultó. La técnica de separación inmunomagnética basada en la interacción entre antígenos de superficie bacteriana y los anticuerpos específicos unidos a las perlas inmunomagnéticas es una herramienta útil para concentrar a *Map* en una solución heterogénea

mediante un soporte magnético, sin exponer a los efectos negativos de los decontaminantes corrientemente utilizados.