



Foto: Martín Fraga

HERRAMIENTAS PARA LA DETECCIÓN DE *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* AGENTE CAUSAL DE LA PARATUBERCULOSIS BOVINA

M.V. MSc. Marina Mauren Berón
Lic. Bioq. PhD Sofía Fernández Ciganda
Vet. Esp. Federico Giannitti
Lic. Bioq. MSc. PhD Martín Fraga

Plataforma de Investigación en Salud Animal,
INIA La Estanzuela

La paratuberculosis bovina causa impactos importantes en la producción. En este artículo se presentan métodos de diagnósticos disponibles y el uso de herramientas moleculares para monitorear al agente causal.

La paratuberculosis bovina es una enfermedad infecciosa entérica, crónica, producida por *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (MAP). Afecta a varias especies animales entre las que se encuentran ruminantes de importancia económica como los bovinos, ovinos y caprinos. Debido a su carácter crónico, la mayoría de los casos cursa con una forma subclínica y un reducido grupo de animales presenta cuadros clínicos de diarrea persistente, pérdida de peso, caída en la producción láctea (en animales lactantes) y muerte (Figura 1).

La transmisión ocurre principalmente por vía fecal-oral. La bacteria es eliminada por las heces, contamina el ambiente y es ingerida por animales susceptibles. En el ambiente, y dependiendo de las condiciones, el microorganismo puede permanecer viable por varios meses. Otras fuentes de infección incluyen la leche y el calostro de vacas infectadas. La transmisión también puede ser por vía transplacentaria (intrauterina); aproximadamente el 9 % y el 39 % de los terneros nacidos de vacas con enfermedad subclínica y clínica, respectivamente, adquieren la infección en el útero.



Figura 1 - Vaca con pobre condición corporal (pérdida de peso) causada por paratuberculosis.

Esta enfermedad se caracteriza por un largo período de incubación (tiempo transcurrido desde la infección hasta la aparición de los primeros signos clínicos), que puede variar de dos a siete años. Los terneros presentan mayor susceptibilidad a la infección por MAP, aunque dado el largo período de incubación los signos clínicos se presentan en la edad adulta. Muchas veces los animales infectados son descartados por otros motivos antes de manifestar signos clínicos de paratuberculosis.

DIAGNÓSTICO Y DETECCIÓN DE MAP EN INIA LA ESTANZUELA

El diagnóstico de la paratuberculosis bovina es complejo debido a su largo período de incubación, además, las pruebas de detección no suelen presentar buena sensibilidad y/o especificidad. En la Plataforma de Investigación en Salud Animal (PSA) de INIA La Estanzuela se realizan las siguientes metodologías de diagnóstico de la enfermedad y detección de MAP:

1) Examen patológico (necropsia e histología): en la necropsia se observa engrosamiento de la mucosa del intestino, principalmente en el ileon y la válvula ileocecal (Figura 2A), que histológicamente se caracteriza por enteritis granulomatosa con micobacterias intracelulares.

2) ELISA para detectar anticuerpos anti-MAP. Un resultado positivo indica exposición al agente, un resultado negativo no la descarta.

Por cada animal con signos clínicos probablemente haya de 15 a 25 animales infectados.

3) Tinción de Ziehl-Neelsen (ZN) para visualizar micobacterias en frotis de materia fecal o improntas de mucosa intestinal (Figura 2B).

4) Cultivo: aislamiento bacteriológico de MAP. Si bien es considerada la prueba de referencia, se puede tardar hasta 16 semanas en obtener un resultado dado que es un agente de crecimiento lento (Figura 2C).

5) Técnicas moleculares: PCR (Figura 2D) y PCR en tiempo real (qPCR). Son métodos rápidos y con buena sensibilidad y especificidad. Además, la qPCR permite cuantificar la carga de MAP.

En un estudio realizado por la PSA se buscó determinar qué muestras podían ser útiles para la detección y el monitoreo de MAP. Para esto se usaron animales seropositivos por ELISA y muestras ambientales de un establecimiento con la enfermedad.

Se analizaron muestras de materia fecal y leche de forma individual, de leche de tanque de leche, *pool* de materia fecal obtenidos del piso del corral de espera pre-ordeño y del camino de acceso al corral de espera pre-ordeño. Los *pool*s se hicieron combinando ocho muestras de sitios diferentes de la misma área.

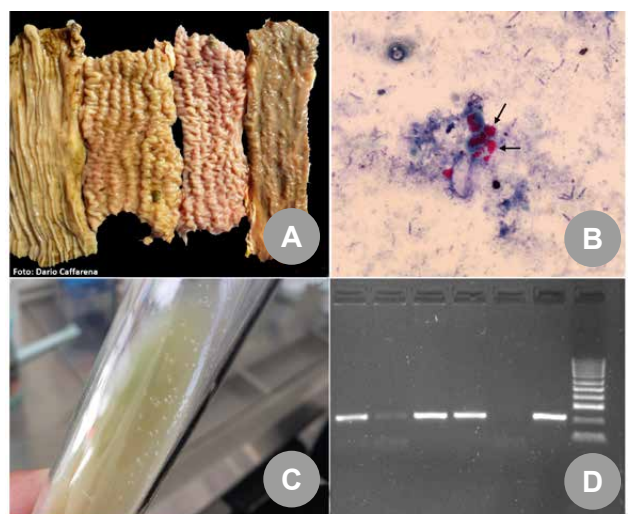


Figura 2 - A: Engrosamiento de la mucosa intestinal en un bovino con paratuberculosis. B: Frotis de materia fecal teñido con Ziehl-Neelsen y observado bajo microscopio óptico; se aprecian cúmulos de bacterias (bacilos) de color fucsia, representando MAP. C: Aislamiento de MAP en medio de cultivo. D: Detección de MAP por PCR.

Se compararon las técnicas de ZN en frotis fecal, PCR y qPCR en heces. Como era esperable, hubo mayor porcentaje de detección empleando la qPCR (Figura 3). Esta técnica presenta muy buena sensibilidad, especificidad y también permite la cuantificación. Se determinó que la prueba de coloración de ZN en frotis fecal sería de utilidad solo cuando la carga de MAP en la muestra es alta.

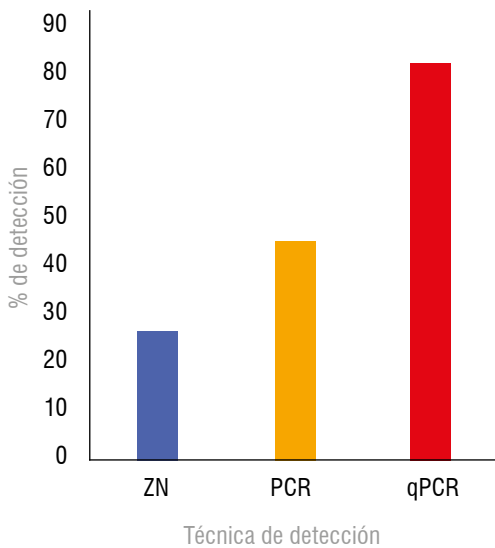


Figura 3 - Detección de MAP en heces individuales por las técnicas de ZN, PCR y qPCR. Las mismas muestras (n= 52) fueron analizadas por las tres técnicas.

Se observó que la eliminación de la bacteria en heces fue más constante, en comparación con las muestras de leche, que presentaron positividad intermitente. El porcentaje de detección en heces y leche fue de 82,7 % y 32 %, respectivamente.



Figura 4 - Vaquillonas en el tambo de INIA La Estanzuela.

En las muestras de tanque de leche no se logró detectar MAP. Es posible que esto se deba a que la leche de vacas excretoras de MAP se diluye con la de vacas no excretoras, determinando una menor carga en la leche de tanque. Por otro lado, se detectó MAP en el pool de materia fecal del corral de espera pre-ordeño y el camino de acceso al corral de espera pre-ordeño en todos los muestreos.

Estos resultados sugieren que las muestras ambientales son buenas para la detección y el monitoreo de MAP en los establecimientos.

RESULTADOS LOCALES

En la PSA se analizaron muestras de materia fecal y suero de 17 establecimientos lecheros del departamento de Colonia. Cinco establecimientos enviaron suero del total de los animales del predio; la seroprevalencia real varió de 0 a 10,5 % (Cuadro 1).

Cuadro 1 - Seroprevalencia real de paratuberculosis (ELISA) en cinco establecimientos lecheros.

Establecimiento	Animales analizados	Positivos	Seroprevalencia %
1	139	10	10,5
2	803	41	7
3	530	10	1,5
4	162	1	0
5	399	2	0

Cuadro 2 - Detección de MAP por qPCR en materia fecal de 17 establecimientos lecheros.

Establecimiento	Muestras procesadas	Positivos	Positividad (%)
1	8	5	62,5
2	1	1	100
3	1	1	100
4	21	0	0
5	1	0	0
6	5	3	60
7	2	1	50
8	1	1	100
9	2	2	100
10	2	1	50
11	1	1	100
12	1	1	100
13	9	6	66,7
14	139	2	1,4
15	157	2	1,3
16	399	2	0,5
17	25	17	68

El diagnóstico de la paratuberculosis bovina es complejo debido a su largo período de incubación, además, las pruebas de detección no suelen presentar buena sensibilidad y/o especificidad.

Diez establecimientos enviaron muestras de suero de animales con sospecha de paratuberculosis. El 70 % (7/10) tuvo, al menos, un animal seropositivo. Los 17 establecimientos remitieron muestras de materia fecal para detección de MAP (Cuadro 2).

PERSPECTIVAS DE USO DE LAS HERRAMIENTAS EN EL MONITOREO DE LA ENFERMEDAD

En base a los resultados mostrados, los muestreos ambientales (pool de materia fecal recolectada de ambientes donde se concentra el ganado) podrían ser de utilidad para el monitoreo del estado de infección por MAP del rodeo. La posibilidad de cuantificar MAP por qPCR en el ambiente puede ser una herramienta para evaluar la evolución de la carga de MAP en el establecimiento.

Esta herramienta puede tener aplicabilidad práctica en el control de la paratuberculosis bovina en rodeos de Uruguay.

REFERENCIAS

Beth, M. A., & Collins, D. M. (2010). Paratuberculosis Organism, Disease, Control.

Committee on Diagnosis and Control of Johne's Disease. (2003). Diagnosis and Control of Johne's Disease. In National Academies Press.

WOAH. (2021). Paratuberculosis (Johne's disease). In: Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals (Chapter 3.1.16, pp. 1–16).

Slana, I., Kralik, P., Kralova, A., & Pavlik, I. (2008). On-farm spread of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in raw milk studied by IS900 and F57 competitive real time quantitative PCR and culture examination. International Journal of Food Microbiology, 128(2), 250–257.

Los muestreos ambientales podrían ser de utilidad para el monitoreo del estado de infección por MAP del rodeo.