

PRIMER INFORME DE AISLAMIENTO DE *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* EN EL PERÚ.

Ortiz M. M.¹, ± Acosta A. M.², Acosta G. R.³, Zumarraga M. J.⁴

RESUMEN.

La enfermedad de Johne es una infección contagiosa, crónica, debilitante y usualmente fatal, que afecta a los rumiantes. Provoca una enteritis granulomatosa con compromiso primario del intestino y es causada por *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*

Se cultivó una muestra de materia fecal en medios con y sin micobactina, y luego de obtener crecimiento de colonias se comprobó la presencia de bacilos ácido alcohol resistentes. Por PCR se detectó la presencia de la secuencia de inserción IS900, confirmándose la presencia de *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*

INTRODUCCIÓN

La enfermedad de Johne, conocida como paratuberculosis fue reportada por primera vez por Johne y Frothingan (1895) (Silvia *et al.*, 2004). La enfermedad es causada por un bacilo ácido alcohol resistente denominado *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (MAP)

La paratuberculosis, afecta a rumiantes domésticos y salvajes, cursa como una enteritis granulomatosa infecciosa de manera subclínica con un largo periodo de incubación, cuyos signos y manifestaciones clínicas se presentan en la fase final de la infección. Estos solo representan la parte visible del problema ya que existe una proporción del hato que no muestran signos aparentes, aunque son portadores de la enfermedad.

M. paratuberculosis es similar, pero no genéticamente relacionada a *Mycobacterium tuberculosis* y *Mycobacterium bovis*. MAP está 99% relacionada genéticamente a *Mycobacterium avium subsp. avium*, pero tiene diferentes características fenotípicas como: 1) crecimiento lento, 2) requiere se le adicione un transportador químico de hierro conocido como micobactina cuando crece in vitro, 3) forma colonias rugosas en medios de cultivo sólidos, y 4) infecta a mamíferos en lugar de aves. También, la distribución medioambiental del MAP es marcadamente diferente al de *M. avium subsp. avium*, que crece en muchos lugares fuera del cuerpo (USDA. 2009).

MAP es un pequeño bacilo (0.5 x 1.5 µm), aerobio e intracelular facultativo. Posee pared celular cerosa rugosa con una estructura trilaminar, compuesta densamente por una mezcla cerosa de lípidos únicos y polisacáridos pero carece de antígenos de glicoproteínas sobre su superficie. Esta clase de pared celular facilita la resistencia del *Mycobacterium* a los factores físicos (calor, frío, luz solar, secado, etc.) y desinfectantes comunes. MAP puede encontrarse en tierra o muestras de agua, sobrevive pero no crece o se multiplica. Se lo ha encontrado después de la contaminación fecal vía un animal

¹ Ortiz Morera, Martín Vicente. Responsable del Laboratorio de Bacteriología - Centro de Diagnóstico de Sanidad Animal – Servicio Nacional de Sanidad Agraria – SENASA – Ministerio de Agricultura. Perú

² ± In Memoriam. Acosta Andrade, Miguel. Consultor - Ex Profesor Principal a dedicación exclusiva de Microbiología y Serología de la Facultad de Medicina Veterinaria – Universidad Nacional Mayor de San Marcos – Lima, Perú, gran Maestro que nos dejó pero sus enseñanzas y sus valores siempre quedarán con nosotros.

³ Acosta Gálvez, Roberto. Jefe de Oficina de Centros de Diagnóstico y Producción del Servicio Nacional de Sanidad Agraria – SENASA – Ministerio de Agricultura. Perú.

⁴ Martín José Zumarraga. Instituto de Biotecnología CICVyA-Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria - INTA - Argentina.

infectado: casi cuatro años después en material orgánico desecado, un año en charcos y heces (suelos y fertilizantes), 170 a 180 días en corriente de agua, etc. (USDA. 2009).

Un estudio de fábricas de productos lácteos en Estados Unidos de Norteamérica (USA), señala que aproximadamente 22% de establos lecheros tienen al menos 10% de su rebaño infectado con MAP. El estudio determinó que los establos con poca cantidad de animales con signos clínicos, tienen una pérdida de \$40 por animal. Aquellos con gran cantidad de animales con signos clínicos, tienen una pérdida de \$227 por animal. Esta pérdida es debida a la reducción en la producción lechera, selección temprana y pobres condiciones de selección. El costo de la enfermedad de Johne en establos de carne, todavía necesita ser determinado (USDA. 2009).

Hoy en día existe mucha discusión referida a su carácter zoonótico, esto debido a que se le ha comparado con la enfermedad de Crohn, pero los investigadores no han llegado todavía a un consenso concluyente.

La enfermedad se disemina fácilmente a través del comercio, movimiento y transporte de animales; los productos suelen contener pocas bacterias, siendo por lo tanto su diseminación de baja performance para comprometer localidades y regiones, no obstante rastros de heces de animales contaminados y el calostro pueden infectar a animales susceptibles.

La enfermedad de Johne se ha reportado en casi todos los continentes, ocasionando pérdidas económicas importantes para la industria ganadera. En Argentina se calcula un promedio del 7- 19,6% de prevalencia para algunas de sus regiones. En Ontario (Canadá) se calcula una prevalencia estimada del 2,6% para el ganado bovino lechero (Cano S. 2009), en Nueva Zelanda el 60% de los rebaños están infectados, en Holanda el 55%, en Dinamarca el 47%, en USA el 22% de los rebaños de leche y el 8% de los de carne, en Bélgica el 22%, en Australia (Victoria) el 17%, en Inglaterra el 17%, en Chile entre el 2,8% y 16% de animales y el 36,9% - 78,6% de rebaños infectados . (Kruze J. 2006).

Esta enfermedad está incluida en la lista de enfermedades de notificación obligatoria de la Organización Internacional de Epizootias (OIE). El Perú, a través del Servicio Nacional de Sanidad Agraria (SENASA) ha notificado en el 2008 la ocurrencia de esta enfermedad (en la provincia de Lima y la región de Lima). Se puede observar en la pagina web http://www.oie.int/wahis/public.php?page=country_status&year=2008. de - World Animal Health Information Database (WAHID) Interface..

En el trabajo de Cano (2009), realizado en la región de Lima, encontró una seroprevalencia corregida del $6,9 \pm 3.3\%$ en animales con anticuerpos contra MAP. Benito para la misma región en el año 1999, reporta una prevalencia de 29%, pero con diferentes poblaciones y con diferentes kits de ensayo

Actualmente, está en discusión la asociación entre de *Mycobacterium avium subesp. paratuberculosis*, la enfermedad de Crohn. En ambas enfermedades hay muchas similitudes (Kruze 2006), por ejemplo la localización de las lesiones (ilion y colon, nódulos linfáticos mesentéricos, ano y recto), las características macroscópicas (apariencia microscópica, edema parietal y aspecto de la mucosa), la apariencia microscópica (afectación transmural, agregados linfoides, granulomas, ausencia de

caseificación), síntomas (diarrea y pérdida de peso), manifestaciones extraintestinales (granulomatosis hepática). (Unión Europea 2000). Adicionalmente a lo manifestado, Kruze menciona que se ha aislado MAP en el 50% de pacientes con la enfermedad de Crohn.

CARACTERÍSTICAS DE LA ENFERMEDAD

La paratuberculosis en primer lugar afecta a la porción terminal del intestino delgado



(íleon). La pared del íleon contiene un gran número de focos de tejido linfático conocido como las placas de Peyer que se encuentran justo debajo de la superficie interior del intestino (USDA 2009). Las placas de Peyer son grupos de macrófagos y linfocitos que están organizados como los ganglios linfáticos. Cubriendo las placas de Peyer están capas de células llamadas células M. Estas células actúan circulando en el lumen de los intestinos donde ingieren a los antígenos (bacterias)

antes de retornar a las placas de Peyer para "mostrar" estos antígenos a los macrófagos y los linfocitos. Esta es una manera de "educar" las células de un animal joven con su entorno y es un mecanismo de protección diseñado para ayudar al animal convirtiendo su sistema inmune a los agentes patógenos de su entorno. Desafortunadamente, cuando las células M llevan MAP a las placas de Peyer, la bacteria se encuentra un lugar ideal para el crecimiento. Macrófagos en las placas de Peyer acechan al MAP con la intención de destruir el invasor extranjero, pero por razones que no están claras, estos macrófagos no lo hacen. Dentro de un macrófago el MAP se multiplica hasta que finalmente mata a la célula, se propaga e infecta a otras células cercanas. Con el tiempo, en otras partes del íleon y en otras regiones del cuerpo se han unido con millones de micobacterias. Cómo neutraliza el MAP o evade la eficiencia normal de los macrófagos para activar el mecanismo de destrucción bacteriana es desconocido. El sistema inmune del animal reacciona a la invasión del MAP mediante el compromiso de más linfocitos y macrófagos al sitio de la infección. Los linfocitos liberan citocinas en un intento de aumentar el poder de matar a las bacterias de los macrófagos. Los macrófagos se unen formando células grandes, llamadas células gigantes multinucleadas, en una aparente intento de matar a las micobacterias. La infiltración de los tejidos infectados con millones de linfocitos y macrófagos lleva a un engrosamiento visible de los intestinos; esto resulta evitando la absorción de nutrientes y diarrea. A finales de la infección, la producción de anticuerpos para el MAP se produce en los animales y es un indicador de que los



signos clínicos de la enfermedad y la muerte por la infección están cerca.

La sintomatología es raramente evidente hasta 2 o más años después de la infección inicial sobre todo en aquellos animales que están próximos al parto. La infección usualmente ocurre inmediatamente después del nacimiento. Los animales son más susceptibles para la infección en el primer año de vida (USDA 2009). Las crías pueden ser infectadas a menudo por el consumo de pequeñas cantidades de estiércol infectado. Adicionalmente, las crías se pueden contagiar en el útero o por ingerir las bacterias en la leche y calostro. Los animales expuestos a una edad mayor o a pequeñas cantidades de bacterias a una edad joven, no desarrollan la enfermedad clínica hasta después de mucho más de dos años.

Los síntomas de la enfermedad de Johne incluyen pérdida de peso y diarrea con apetito normal, no presenta fiebre, presenta pelo seco y erizado. Varias semanas después del inicio de la diarrea, una hinchazón suave ocurre bajo la mandíbula (mandíbula de botella). El edema intermandibular se da por la pérdida del flujo de proteínas en el tracto digestivo. Los animales en este estado de la enfermedad no viven mucho tiempo, quizás unas pocas semanas más (USDA 2009).

Normalmente en el animal enfermo se encuentra mayor cantidad de micobacterias en la mucosa intestinal, en los ganglios linfáticos mesentéricos adyacentes, aunque la lesión generalmente se extiende desde el ileon hasta el recto (USDA 2009).

MATERIALES Y MÉTODOS

La muestra provino de un animal macho de raza Holstein, de 4 años de edad, procedente de los alrededores de Lima. No presentaba ninguna sintomatología y era negativo para tuberculosis y brucelosis (a las pruebas de PPD bovino caudal simple y rosa de bengala respectivamente). En marzo de 2008 se requiere de tamizaje serológico para la detección de Paratuberculosis, ya que iba a ser introducido en un grupo de animales.

El ELISA (con *Mycobacterium avium subesp. paratuberculosis* pegado y con *Mycobacterium phlei* en el diluyente de muestras para la remoción de las reacciones cruzadas) fue positivo con un índice de positividad de 2.151 (el ensayo tiene con un punto de corte de 0.25).

Posteriormente, se toma una muestra de heces directamente del recto, que fue procesada de acuerdo al Manual de Procedimiento Técnico de Diagnóstico de Paratuberculosis – SENASA – Argentina (versión 1.0. Año 2000).

CULTIVO.- La muestra inicial fue decontaminada con hexadecilpiridinio y sembrada en medios Herrold con y sin micobactina (*Alid monitor*), luego de lo cual se espero un



tiempo (6 semanas) superior al de otras micobacterias no tuberculosas para poder observar el crecimiento de colonias en los medios. Las colonias primarias de MAP tienen una dependencia estricta a la micobactina, para su

crecimiento, que es considerada una característica taxonómica del MAP.

La identificación de las colonias compatibles con MAP que desarrollaron en los medios con micobactina fue verificado mediante la coloración ácido alcohol resistente de Ziehl Nielsen, habiéndose detectado la presencia de estos bacilos agrupados en nidos característicos.

Las pruebas bioquímicas habituales en la tipificación de micobacterias, así como la resistencia ó sensibilidad a determinados antibióticos, son poco efectivas a los fines de clasificar a este bacilo, por ello se debe emplear la detección de secuencias blanco de ADN específicas del microorganismo.

Se han desarrollado sondas de ADN que permiten detectar MAP en distintos tipos de muestras como así también para identificar rápidamente las bacterias aisladas. McFadden y colaboradores han identificado la secuencia de inserción, IS900, específica de MAP, que permite su diferenciación de otras micobacterias como *M. avium* subsp. *avium* con la que suele confundirse durante la tipificación bacteriológica por pruebas bioquímicas.

Se han empleado para diferenciar *M. paratuberculosis* de otras micobacterias, especialmente aquéllas del grupo de *M. avium*.

Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

Preparación del templado: Una ansada de colonias se resuspendió en agua bidestilada estéril y se incubó a 100°C x 50 minutos, para lisar las colonias y liberar el ADN. Luego de centrifugar a 12000RPM durante 5 minutos, 5uL del sobrenadante se utilizaron como templado para la realización de la PCR.

DETECCIÓN DE LA SECUENCIA DE INSERCIÓN IS900.

Los *primers* empleados fueron:

- 1) DirC (GATCGGAACGTCGGCTGGTCAGG) y
- 2) Rev C (GATCGCCTTGCTCATCGCTGCCG), Collins *et al.*, 1993

La mezcla de reacción consistió en *buffer* Taq (10mM Tris-HCl, pH 9.0; 50 mM KCl y 0.1% Triton X-100), 1,5 mM MgCl₂, 0,2 mM de cada oligonucleótido trifosfato, 1 mM de cada *primer* 5 µL de templado y 1,25 U de Taq DNA polymerase b (Promega, USA) en un volumen final de 50µL. La reacción se llevó a cabo en un termociclador Amplitron II (Thermolyne) siguiendo el siguiente protocolo:

- a) Desnaturalización inicial: 94°C, 3 minutos
- b) 30 ciclos de: 94°C, 1 minuto, 62°C, 1 minuto y 72°C, 1 minuto.
- c) Extensión final: 72°C, 8 minutos

Las muestras amplificadas se sometieron a electroforesis horizontal en gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio. La visualización se realizó mediante exposición del gel a un transiluminador de luz ultra violeta. El producto obtenido fue de 217 pb.

Adicionalmente, y para descartar la presencia de micobacterias del complejo *M. tuberculosis*, se investigó la presencia de las secuencias de inserción IS6110 (Hermans *et al.*, 1990) e IS1081 (de Wards *et al.*, 1995)

RESULTADOS

Cultivo: A las 6 semanas de sembrado se observó la presencia de colonias pequeñas convexas, blancas, de bordes lisos; en los medios con micobactina. En, el medio sin micobactina no se observó crecimiento.

Tinción: mediante la coloración de Ziehl Nielsen, se observó la presencia de bacilos ácido alcohol resistentes dispuestos en forma de nidos.

Pruebas bioquímicas: Se observó crecimiento solo en presencia de micobactina, mientras que no hubo desarrollo a temperatura ambiente, ni a 42°C y tampoco produce pigmentos.

ELISA: se utilizó el *kit* comercial (HerdChek, Idexx, USA), donde se obtuvo un índice de positividad de 2.151. El; punto de corte se considera igual a 0.25.

PCR: Se detectó la presencia de la secuencia de inserción IS900 en la muestra analizada (figura 1) mientras que no hubo amplificación cuando se investigó la presencia de IS6110 e IS1081 (datos no mostrados).

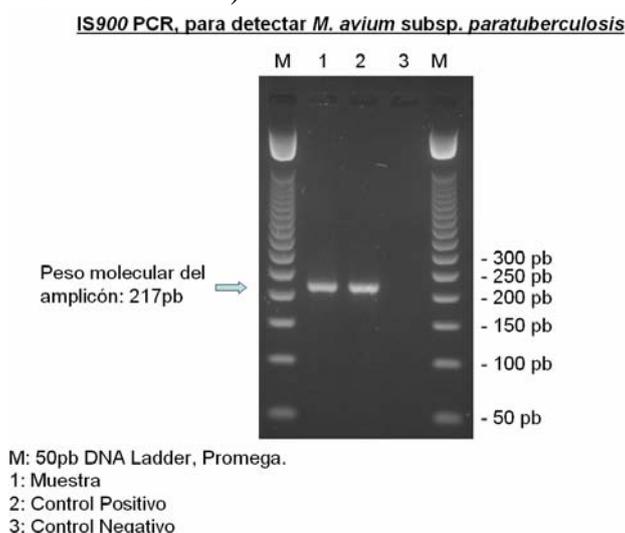


Figura 1: Gel de agarosa al 1 % mostrando el producto de PCR de la amplificación de la secuencia de inserción IS900. 1: Muestra; 2: Control positivo; 3: Control negativo M: marcador de peso molecular 50pb DNA Ladder, Promega.

DISCUSION

El desarrollo de colonias aisladas de materia fecal de un bovino asintomático, en medio Herrold con micobactina, la presencia de bacilos ácido alcohol resistentes de morfología característica a la observación microscópica, sumado a la identificación por PCR de IS900 permiten concluir que este aislamiento corresponde a *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* constituyéndose así en el primero en Perú.

Debido a este hallazgo, los cultivos fueron remitidos al Instituto de Biotecnología del Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria – INTA, Castelar Argentina y al Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria SENASA – Argentina (Laboratorio de Referencia de la Organización Mundial de Sanidad Animal – OIE); confirmando los resultados obtenidos.

A partir de este antecedente, las inspecciones veterinarias tendrán en cuenta la presencia de este patógeno para el diagnóstico de enfermedades infecciosas que producen diarreas en los bovinos, pudiendo adoptar las estrategias de manejo del ganado adecuadas para controlar y evitar la diseminación a otros hatos. Entre éstos, se encuentra el tratamiento térmico de la leche destinada a la alimentación de terneros o la administración de sustitutos lácteos, diagnosticar a todos los animales de la granja (también otras especies animales) y la separación de los positivos, previa evaluación vacunación, ofrecer agua limpia a los animales, manejo de pasturas y estercoleros, etc. (DEFRA 2009).

Asimismo, debido a su potencial riesgo para el hombre, es necesario poner énfasis en evitar el consumo de leche cruda, aunque algunos autores han informado haber aislado MAP de productos pasteurizados (Grant et al., 2005; O'Reilly et al 2004; Cirone et al., 2007).

La detección de este primer aislamiento en el Perú, es la primera instancia para erradicar la enfermedad de nuestro país.

AGRADECIMIENTO

Este trabajo no se hubiera podido finalizar sin el valioso apoyo del Fondo Argentino de Cooperación Horizontal (FOAR), que permitió la visita de los Doctores Fernando Paolicchi y Martín José Zumárraga, expertos del INTA, que implementaron en los Laboratorios del SENASA pruebas moleculares en el diagnóstico de Micobacterias.

BIBLIOGRAFIA

1. AAVLD – Comisión científica de micobacterias (2005): Manual de diagnóstico de micobacterias de importancia en Medicina veterinaria.
2. Cano Céspedes Sofía. (2009) Seroprevalencia del *Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis* en tres establos lecheros de la región de Lima
3. Cirone K, Morsella C, Romano M, Paolicchi F. Rev Argent Microbiol. 2007 Jan-Mar;39(1):57-68. *Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis* in food and its relationship with Crohn's disease.
4. Collins, D.; Stephens D. & de Lisle G., (1993): Comparison of polimerase chain reaction tests and faecal culture for detecting *Mycobacterium paratuberculosis* in bovine faeces. Vet. Microbiol. 36, 289–299.
5. DEFRA United Kingdom. (2009): Guidance on control of Johne's disease in dairy herds
6. Francis, J. Macturk Medinaveitia J. and Snow G.A. (1953): Mycobactin a growth factor for *Mycobacterium jhoni* Biochem. J. 55.
7. Grant IR, Williams AG, Rowe MT, Muir DD. Appl Environ Microbiol. 2005 Jun;71(6):2853-61. Efficacy of various pasteurization time-temperature conditions in combination with homogenization on inactivation of *Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis* in milk.
8. Hermans, P.W., van Soolingen, D., Dale, J.W., Schuitema, A.R., McAdam, R.A., Catty, D., van Embden, J.D. (1990) Insertion element IS986 from *Mycobacterium tuberculosis*: a useful tool for diagnosis and epidemiology of tuberculosis. J. Clin. Microbiol. 28:2051-2058.
9. Kruze Juan. (2006): Paratuberculosis Bovina: una enfermedad emergente.
10. M.G.D.V.M. Ms Fincher, D.V.M. W.J. Gibbons, D.V.M. S.E. Park. Enfermedades del Ganado Bovino
11. Moreira A.R. Paolicchi F., Morsella C., Zumárraga M., Cataldi A., Bigi F., Alito A., Overduin P, van Soolingen D., Romano M.I. Veterinary Microbiology (1999):70, 251-259. Distribution of IS900 restriction fragment length polymorphism types among animal *Mycobacterium paratuberculosis* isolates from Argentina and Europe”.
12. O'Reilly CE, O'Connor L, Anderson W, Harvey P, Grant IR, Donaghy J, Rowe M, O'Mahony P. Appl Environ Microbiol. 2004 Sep;70(9):5138-44. Surveillance of bulk raw and commercially pasteurized cows' milk from approved Irish liquid-milk pasteurization plants to determine the incidence of *Mycobacterium paratuberculosis*.

13. Organización Mundial de Sanidad Animal OIE (2004): Manual de Diagnóstico de Enfermedades de los animales Terrestres y de las Aves - quinta edición
14. Paolicchi, F.; Zumárraga, M.; Gioffré, A.; Zamorano, P.; Morsella, C.; Verna, A.; Cataldi, A.; Alito, A. & Romano, M.I. (2003): Application of different methods for the diagnosis of paratuberculosis in a dairy cattle herd in Argentina. J.Vet. Med.: 20-26
15. SENASA – Argentina – Referente OIE (2000): Manual de Procedimiento técnico Diagnóstico de Paratuberculosis.
16. Sylvia C., Martin A., Mejia G., Palomino J., Robledo J., Telles M., Portaels F., (2004): Practical Handbook for the phenotypic and genotypic identification of mycobacteria.
17. Union European SANCO/B3/R16/2000 (2000): Possible links between Crohn's disease and Paratuberculosis.
18. USDA – APHIS (2009): Animal Health - Johne's Disease.
19. Wards, B.J., Collins, D.M. & Lisle, G.W. (1995)Vet. Microbiol. 43, 227-240. Detection of Mycobacterium bovis in tissues by polymerase chain reaction.
20. World health organization (1996): Guidelines for speciation within the Mycobacterium tuberculosis complex.