

AISLAMIENTO DE MICOBACTERIUM PARATUBERCULOSIS

(M. JOHNEI) EN BOVINOS EN EL URUGUAY

F. Errico ¹
J. Bernádez ¹

RESUMEN

Se procesaron en el laboratorio, 20 materiales que pertenecían a 5 bovinos lecheros con sintomatología clínica de paratuberculosis.

Los frotis directos (de materias fecales, mucus rectal, ileon terminal, válvula ileo-cecal y ganglios ileo-cecales) y teñidos por Ziehl-Neelsen fueron 18 positivos y 2 negativos.

Se aisló M. johnei de 13 materiales, utilizando el medio de Herrold con yema de huevo y micobactina.

Se establecen conclusiones y se recomiendan medidas de lucha para el control de la enfermedad.

INTRODUCCION

La paratuberculosis es una enfermedad de curso crónico ampliamente difundida en todo el mundo y que afecta principalmente a los bovinos, aunque también se la encuentra en ovinos y caprinos, siendo rara en equinos y cerdos, no habiéndose registrado casos en el hombre. (9) (14) (16)

Es posible encontrarla en ruñantes salvajes y experimentalmente se puede reproducir la enfermedad en ratones, conejos y hamsters. (4) (7) (10) (17)

La enfermedad es considerada enzoótica en varios países de Europa como Inglaterra, Holanda, Bélgica, Francia, Dinamarca y la URSS. También se encuentra presente en EEUU y Canadá. (15) (20)

En nuestro país, los primeros casos reconocidos en los bovinos fueron realizados por los Dres. A. Cassamagnaghi y A. Cassamagnaghi (h) en 1945. (1)

¹ Médicos Veterinarios, Técnicos del Departamento de Bacteriología del Centro de Investigaciones Veterinarias "Miguel C. Zubini", Km. 20 Ruta a "Brig. --- Gral. Juan A. Lavalleja", Foz de Canelones; Casilla de Correo 6577, Montevideo, Uruguay.

Posteriormente, los informes fueron escasos y en los últimos 10 años se comunicaron posibles focos de paratuberculosis en bovinos y ovinos por diagnóstico clínico e histopatológico, pero en ningún caso se confirmó el diagnóstico por aislamiento del M. johnei*.

El diagnóstico de la paratuberculosis bovina en los países con campaña de control o erradicación de la tuberculosis bovina es importantísimo, ya que de hecho la enfermedad causa reacciones no específicas a la tuberculina mamífera y cuando esta enfermedad se presenta al mismo tiempo puede acarrear problemas de falsos positivos.

Esto se ve especialmente en animales jóvenes recién infectados y en animales viejos, cuando la enfermedad está en su etapa más activa, generalmente antes de aparecer la sintomatología clínica. (13)

En base a lo anteriormente expuesto, el propósito del presente trabajo es el de informar del aislamiento de M. johnei en bovinos y recomendar las medidas de control pertinentes para evitar los perjuicios económicos que pueda acarrear en el futuro.

MATERIALES Y METODOS

Las muestras procesadas provenían de establecimientos lecheros con sospecha clínica de paratuberculosis, presentando los animales diarrea, emaciación crónica, papera y al test comparativo cervical, franca reacción a la tuberculina aviar - con respecto a la bovina.

En total se procesaron, de 5 bovinos, 8 materias fecales, 4 muestras mucus rectal, 4 de trozos de tubo digestivo (ileon terminal y válvula ileo-cecal) y 4 de ganglios ileo-cecales, correspondientes a dos establecimientos.

El diagnóstico se basó en los métodos bacteriológicos e histopatológicos.

1. Procesamiento de materias fecales:

1.1. Diagnóstico bacteriológico:

1.1.2. Colección, envío e identificación:

La muestra fecal se tomó del recto con guante (que se utilizó una sola vez).

Se recogieron 15 gr. aproximadamente y se colocaron en frasco estéril - con tapa de rosca.

Se identificó el frasco, se selló con tela adhesiva y se transportó al laboratorio sin refrigerar; no se le agregó preservativo químico. Un formulario adjunto con la identificación de establecimiento y animales, así como la historia clínica correspondiente, acompañó la muestra.

1.1.3. Suspensión y descontaminación:

Se transfirió aproximadamente 1 gr. a un tubo centrífuga de 50 ml. con 40 ml. de agua destilada estéril. Se mezcló y se dejó sedimentar durante 30 minutos, a temperatura ambiente. Luego se recogió el sobrenadante y se le agregó 10 ml. de ácido oxálico al 5%, se mezcló y se dejó 24 horas en heladera a 4 - 7°C.

1.1.4. Inoculación de los medios de cultivo:

El medio que se utilizó fue medio de Herrold con yema de huevo con y sin micobactina. (2)

La micobactina, que es un factor de crecimiento imprescindible para el M. johnei, especialmente en primo cultivo, se obtuvo del M. phley y se procesó en el C.I.VET. "Miguel C. Rubino", de acuerdo al método utilizado en el Institut National de Recherches Vétérinaires, Bruxelles. (5)

* Comunicaciones personales de los Dres. R. Luaniz Rivara, H. Podestá, J. Martínez, L. Bolla, E. Pardoño.

Para inocular los medios de cultivo se utilizó pipeta Pasteur estéril y se sembró 0,1 ml. del sedimento de cada uno de cuatro frascos con medio de cultivo (tres con micobactina y uno sin micobactina).

- 1.1.5. Se realizaron frotis del sedimento y se tiñieron por el método de Ziehl-Neelsen. (2)
- 1.1.6. La incubación se realizó a 37°C durante 16 semanas y se observaron semanalmente.
- 1.1.7. La identificación se realizó por la observación de colonias en los medios con micobactina y que al hacer frotis y teñirlos con Ziehl-Neelsen mostraban grupos de bacilos ácido-alcohol resistentes. (2)

2. Procesamiento de los tejidos:

2.1. Colección, envío e identificación:

Cuando se tomaron partes del tubo digestivo se enjuagaron para eliminar las heces; ganglios y otros tejidos se tomaron en forma aséptica y se colocaron en frasco estéril.

Se identificaron de la misma manera que se dijo anteriormente y se transportaron refrigerados al Laboratorio, procesándose dentro de las 72 horas.

2.2. Selección y descontaminación:

Aproximadamente 4 gr. de tejido se seleccionaron de las zonas que presentaron lesiones (hemorragias, erosiones e inflamaciones). Se colocaron en mortero estéril, se trituró y se mezcló durante 30 minutos a temperatura ambiente.

La suspensión se filtró a través de gasa estéril y se centrifugó a 7000 rpm. durante 20 minutos, eliminando el sobrenadante.

Al sedimento se le agregó 10 ml. de ácido oxálico al 5%, se mezcló y se dejó 24 horas en heladera (4 - 7°C).

La siembra, los frotis, la observación de medios de cultivo e identificación, se realizaron como se mencionó anteriormente.

3. Diagnóstico histopatológico:

Las muestras de tejido se fijaron en formol al 10% y los cortes histológicos se tiñieron con hematoxilina-eosina y por el método de Ziehl-Neelsen.

El criterio utilizado para un diagnóstico positivo por histopatología fue un cuadro de enteritis catarral difuso, tipo crónico, debido a infiltración de la lámina propia y submucosa por células epitelioides y/o células gigantes.

Con la coloración de Ziehl-Neelsen se observaron bacilos ácido-alcohol resistentes, la mayoría fagocitados por células mononucleares o libres, fundamentalmente en submucosa.

En los ganglios linfáticos mesentéricos, adenitis aguda, con pérdida de estructura; en las áreas paracorticales, presencia de células epitelioides y/o células gigantes.

Con la coloración de Ziehl-Neelsen pueden observarse bacilos ácido-alcohol-resistentes.

RESULTADOS

Los resultados obtenidos se detallan en el Cuadro 1.

Cuadro 1. Resultados de 20 materiales procesados para el aislamiento de *M. johnei*

Materiales procesados	N° Ziehl-Neelsen		Medio Herrold c/ yema de huevo y sin micobactina		Medio Herrold c/ yema de huevo y con micobactina		Histopatología		
	N	P	N	P	N	P	N	P	
	Materias fecales	8	0	8	7	1	3	5	-
Mucus rectal	4	0	4	4	0	1	3	-	-
Tubo digestivo (ileon terminal) y válvula ileo- cecal)	4	0	4	3	1	0	4	0	4
Ganglios mesentéricos ileo-cecales	4	2	2	4	0	3	1	1	3
T o t a l e s	20	2	18	18	2	7	13	1	7

De los materiales (20) procesados en el Laboratorio, pertenecientes a 5 bovinos, los frotis directos y teñidos por Ziehl-Neelsen, 18 fueron positivos y 2 negativos. (Cuadro 1)

Se observó que la concentración de grupos de bacilos ácido-alcohol resistentes eran diferentes según de qué material se realizaran los frotis. La mayor concentración de microorganismos se observó en los frotis realizados de las zonas con lesiones del tracto digestivo y muestras de mucus rectal. Luego le siguen los frotis de materias fecales y, por último, los ganglios.

Los materiales sembrados en medio de Herrold con yema de huevos, sin micobactina, fueron 18 negativos y 2 positivos, mientras que los sembrados en Herrold con yema de huevo y con micobactina fueron 13 positivos y 7 negativos. (Cuadro 1)

La contaminación de los medios de cultivo por hongos, bacterias y cocos fue mínima ya que de 80 frascos de medios sembrados se eliminaron solamente 5 (6,25%).

DISCUSION

La concentración de microorganismos en los frotis directos y el aislamiento de *M. johnei* concuerdan con lo manifestado por otros autores. (2) (12) (15)

Los aislamientos obtenidos (Cuadro 1) y la baja contaminación confirman que el método de descontaminación y el medio de cultivo utilizado fueron eficaces para el aislamiento del *M. johnei*, ratificando lo obtenido por otros autores. (5) (12) (13).

Debemos tener en cuenta que todos los materiales procesados pertenecían a bovinos con sintomatología clínica de paratuberculosis y ésta sólo se manifiesta en los animales, después de desarrollar lesiones en el tubo digestivo cuando ingieren suficiente número de microorganismos. (3) Pero el aislamiento del *M. johnei* puede obtenerse tanto de casos clínicos como no clínicos. (19)

En condiciones naturales, generalmente la infección se produce por ingestión bucal de agua o comidas contaminadas y la enfermedad puede extenderse y causar seros veros daños en los animales jóvenes, cuando están en estrecho contacto con animales adultos que eliminan *M. johnei*. (15)

Muchos factores influyen en el desarrollo de la enfermedad clínica, posteriormente a la infección, tales como: edad, concentración de microorganismos ingri-

dos, pobre nutrición, "stress", parasitosis y alta producción de leche. (3) (15)
También se ha observado que la susceptibilidad familiar es un factor significativo y ciertas familias son más propensas a desarrollar la enfermedad clínica. (11)

La acidez de los suelos ha sido comunicada como factor predisponente para adquirir la enfermedad clínica en los bovinos, por deficiencia de fósforo. (6)

La significación de la infección congénita o por inhalación se desconoce. (15)

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

1. Dado que en nuestro país hay control oficial de la tuberculosis bovina, es de suma importancia la identificación de rodeos con paratuberculosis.
2. En caso de sospecha de paratuberculosis bovina con o sin sintomatología clínica, realizar test de tuberculina comparativa cervical y, aquellos animales con respuesta franca a la tuberculina aviar, sacarles muestras de materias fecales y mucus rectal para confirmar el diagnóstico en el Laboratorio.
3. En caso de diagnóstico positivo, eliminar los animales para que no sigan difundiendo la enfermedad y al resto del rodeo efectuarle, cada 3 - 6 meses, el test de tuberculina comparativa cervical y eliminar los reaccionantes positivos a tuberculina aviar.
4. Tomar medidas de higiene en bebederos y comederos desinfectando con fenol al 5% o cresoles al 3%.
5. En cuanto al manejo del establecimiento, evitar que diferentes categorías de animales convivan juntos o llevar animales jóvenes a campos que previamente estuvieran con animales adultos enfermos.
6. Se recomienda realizar estudios de los suelos para descartar deficiencia de fósforo en aquellos establecimientos con sospecha de paratuberculosis.
7. Los resultados de este trabajo indican que la enfermedad se encuentra presente a nivel de establecimientos. En caso de sospecha de la enfermedad se recomienda enviar muestras al C.I.VET. para conocer su difusión en nuestro país.

AGRADECIMIENTOS

Se agradece la colaboración de la Dra. Cecilia Paullier en el estudio histopatológico y al Sr. Miguel Castro, Ayudante del Departamento de Bacteriología del C.I.VET. "Miguel C. Rubino".

SUMMARY

Twenty materials belonging to dairy cows with clinical symptomatology of paratuberculosis have been processed in the Laboratory.

The direct smears (from faeces, rectal mucus, the terminal portion of the ileum, the ileo-caecal valve and ileo-caecal lymph nodes) and Ziehl-Neelsen stained showed 18 positives and 2 negatives.

M. johnei was isolated from 13 samples using Herrold media with egg yolk with mycobactine.

Conclusions were made and control rules for our country are recommended.

BIBLIOGRAFIA CONSULTADA

1. CASSAMAGNACHI, A. y CASSAMAGNACHI, A. (h). La enfermedad de Johne, los primeros casos reconocidos en los bovinos del Uruguay. Anales - de la Facultad de Veterinaria. 5 (1): 83-104, 1947.
2. CENTRO PANAMERICANO DE ECONOMIA. Tuberculosis: aislamiento e identificación micobacterias. Monografías científicas y técnicas. C.P.Z. N° 6, 48 p., 1973.
3. CHANDLER, R.L. Infection of laboratory animal with Mycobacterium johnei. J. Comp. Path. 71: 118-130, 1961.
4. CHANDLER, R.L. Variations in susceptibility to infection with Mycobacterium johnei. Vet. Rec. 73: 1207-1210, 1961.
5. DESMECHT, M. Diagnostic de la paratuberculosis. Bruxelles, 1976.
6. FOUQUET, G. and DELAUNE, G. Phosphore et entérite paratuberculeuse. Reel. Med. Vet. Alfort. 136: 467-475, 1960.
7. GILMUR, M.J.L., CAMPBELL, J. and BROTHERSTON, J.G. The pathogenesis of Mycobacterium johnei in orally dosed hamsters. J. Comp. Path. 73: 98-106, 1963.
8. GILMUR, M.J.L. Recent research on Johne's disease. Vet. Rec. 77: 1322-1330, 1965.
9. HAGAN, W.A.; BRUNER, W.D. y GILLESPIE, J.H. Enfermedades infecciosas de los animales domésticos. 3° ed. La Prensa Mexicana, 1970.
10. HIRCH, A. Infection of hamsters and rabbits with Mycobacterium johnei. J. Comp. Path. 66: 260-263, 1956.
11. HOLE, M.H. Johne's disease. In advances in Veterinary Science. Volume 4, -- 342 p. New York. Academic Press, 1958.
12. HOLE, M.H. and MC CLAY, M.H.I. The diagnosis of Johne's disease in cattle and the identification of Mycobacterium johnei infection. Vet. Rec. 71: 1145-1149, 1959.
13. HUITEMA, H. Diagnosis and prognosis of Johne's disease in cattle. Thesis, Utrecht, 1962.
14. JORGENSEN, J.B. Paratuberculosis in pigs. Experimental infection by oral administration of Mycobacterium paratuberculosis. Acta Vet.Scaud. 10: 275-287, 1969.
15. JULIAN, R.S. A short review and some observations on Johne's disease with recommendations for control. Can. Vet. Jour. 16: 33-43, 1975.
16. LARSEN, A.B.; MOON, H.W. and MERKAL, R.S. Susceptibility of horses to Mycobacterium paratuberculosis. Am. J. Vet. Res. 33: 2185-2189, 1972.
17. LOMINSKI, I.; CAMPRON, J. and ROBERTS, G.B.S. Experimental Johne's disease in mice. J. Path. and Bacteriol. 71: 211-222, 1956.
18. MERKAL, R.S. Laboratory diagnosis of bovine paratuberculosis. J.A.V.M.A. 163 (9): 1100-1102, 1973.
19. RANKIN, J.A. The experimental infection of cattle with Mycobacterium johnei. J. Comp. Path. 71: 10-15, 1961.
20. THOEN, C.O. Recent developments in diagnosis of paratuberculosis (Johne's disease). J.A.V.M.A. 174: 838-840, 1979.