

**PARATUBERCULOSIS: ASPECTOS CLINICO PATOLOGICOS Y SU IMPACTO EN LA PRODUCCION (PARTE 1)****Fernando Paolicchi**

Grupo de Sanidad Animal, INTA
Profesor Adjunto, Área de Producción Animal,
Unidad Integrada
EEA INTA-Facultad Ciencias Agrarias, UNMdP.
CC 276, (7620) Balcarce,
Argentina.
E-mail: fpaolicchi@balcarce.inta.gov.ar

INTRODUCCION**Importancia mundial e impacto en la producción.**

La Paratuberculosis (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, un estudio realizado por la F.A.O., concluyó que la PTBC era una de las enfermedades que más seriamente afectaba a la «industria ganadera bovina» y hoy es motivo de intensos programas de control en USA, Australia y Europa.

La prevalencia de la 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 el año 1984 en los Estados Unidos, las pérdidas anuales ocasionadas por PTBC 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, ya que se ha calculado que cuando la prevalencia en un rodeo con enfermedad es igual o mayor al 10% el costo promedio alcanzaría los 200 U\$S / vaca. Estos antecedentes marcan que el control de la PTBC sea considerada de alta prioridad, motivando a otros países desarrollados a aplicar planes de control, con el compromiso del estado, de profesionales veterinarios y de los productores para implementar estrategias de manejo, de diagnóstico y control de la PTBC.

La PTBC bovina es conocida en algunas regiones de la Argentina, pero en general existe desconocimiento de la importancia real del problema. La enfermedad causa importantes pérdidas económicas a los productores y a la industria láctea y cárnica. No sólo se deben considerar las pérdidas de los animales que manifiestan enfermedad clínica, sino también de aquellos denominados portadores sub-clínicos. Estos son animales que aparentan estar libres de la enfermedad pero son portadores de la micobacteria, la eliminan en forma intermitente y pueden terminar manifestando la enfermedad.

Las pérdidas directas por PTBC son:

- a)- disminución en la producción de carne y/o 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.

Desde 1980, se han llevado a cabo trabajos de investigación sobre PTBC en el INTA Balcarce, preferentemente caracterizando la enfermedad y poniendo a punto técnicas serológicas y bacteriológicas necesarias para realizar un diagnóstico confiable. Posteriormente se aplicaron estas técnicas para promover el control voluntario de la PTBC en establecimientos piloto y para realizar una caracterización poblacional de la situación de la enfermedad en distintos sistemas de producción y regiones del país.

Estos trabajos permitieron reconocer la amplia difusión de la PTBC en el ganado bovino de la zona pampeana argentina, especialmente en rodeos lecheros y en rodeos de carne donde la producción se ha intensificado en los últimos años. Asimismo se reconoció a la PTBC como una enfermedad de impacto económico en la cría del ciervo colorado en cautiverio, adquirida posiblemente por contacto con bovinos infectados y por la alta susceptibilidad y estrés que presentan estos animales durante la etapa de cría (Ver trabajo al final: «Diagnostico, Epidemiología y Programas de Control de la Paratuberculosis en Argentina»).

Si bien en Argentina no se cuenta con una caracterización epidemiológica global de la PTBC y tampoco existen datos concretos en Sudamérica. La información recogida por nuestro grupo de INTA Balcarce, indica una seroprevalencia que varía entre el 7,2% y 19,6% en rodeos de cría de la Cuenca del Salado en Provincia de Buenos Aires. Asimismo, se ha determinado que el diagnóstico clínico se ha incrementado entre un 5% y 10%, siendo los valores previos menores del 3%. También se observó un cambio importante en el comportamiento de la enfermedad, con una presentación clínica cada vez más frecuente en animales jóvenes de 12 a 18 meses de edad, incorporándose de esta forma a la invernada como otra categoría de riesgo para la manifestación de PTBC. En estudios previos de Argentina, se estimó una disminución en la producción de carne y/o leche en valores que alcanzarían hasta un 19%. Según los datos de seroprevalencia de PTBC, hemos realizado una estimación preliminar de las pérdidas económicas referentes al valor bruto de la producción, que afectan tanto a productores ganaderos como a los sectores involucrados en la comercialización y el flete, lo que arrojó durante el 2001 una pérdida aproximada de 22.0 millones de U\$S para la zona de cría de la Cuenca del Salado y de 6.3 millones de U\$S para las Cuencas Lecheras de la Provincia de Buenos Aires sin considerar pérdidas adicionales como las descriptas en párrafos anteriores.

LA ENFERMEDAD Y SU ETIOLOGIA

El agente causal, *Mycobacterium avium* subsp *paratuberculosis* (*M.paratuberculosis*), es una micobacteria que infecta bovinos, ovinos y caprinos, además de varias especies de animales silvestres como ciervos, liebres, zorros y roedores, lo que podría explicar en parte la amplia difusión y sobrevivencia de la bacteria en el medio ambiente. Esta bacteria es resistente a condiciones medioambientales adversas y su sobrevivencia en un establecimiento con animales enfermos podría estimarse entre 10 y 12 meses en áreas infectadas con materia fecal de los mismos.



La asociación entre el tipo de suelo y presencia de PTBC en rodeos bovinos de carne con alta o baja seroprevalencia fue estudiada recientemente en USA. Los rodeos establecidos en áreas con suelos tanto arcillosos como arcillo-arenosos fueron también los más frecuentes dentro del cluster de rodeos con la mayor seroprevalencia de la enfermedad. Se determinó que la infiltración de agua en suelos arenosos es alta lo que disminuye el pH y ello estaría asociado con la predisposición a la presencia de PTBC en animales pastoreando ese tipo de suelo.

Las micobacterias sobreviven mejor en ambientes ácidos y el bajo pH del suelo provee ventaja competitiva con otros microorganismos y condiciones que mejoran su persistencia ambiental. También en el caso de ovejas y cabras la mayor prevalencia de PTBC estaría asociada a establecimientos con suelos de bajo pH y menor retención de agua.

Los bovinos jóvenes son más susceptibles a la infección con *M. paratuberculosis* que los adultos, siendo el momento crítico para la infección los 6 primeros meses de vida del ternero. Esto depende del número de bacterias ingeridas y la edad a la exposición inicial alcanzando la mayor susceptibilidad hasta los 12 meses de edad en áreas altamente contaminadas y la posibilidad de que animales adultos contraigan la infección si la exposición a la bacteria es continuada.

El *M. paratuberculosis* se transmite principalmente por la ruta fecal/oral. Puede también ser transmitido intrauterinamente y por la leche de vacas infectadas, principalmente más aún de aquellas en los últimos estados de la infección cuando se manifiestan los síntomas clínicos de la enfermedad. Por lo tanto, terneros/as hijos de vacas infectadas tienen una alta probabilidad de infectarse por los mecanismos mencionados y no deben usarse como reemplazos.

Cuando los rodeos lecheros presentan una tasa de infección alta, las vacas infectadas eliminan la bacteria por leche y si esta es utilizada para alimentar a sus terneras mediante crianza artificial la enfermedad se disemina exponencialmente y de esta forma se incrementa el porcentaje de animales infectados en el rodeo. La tasa de infección con *M. paratuberculosis* en un rodeo bovino recientemente infectado se incrementa año a año debido a su carácter contagioso a través de mecanismos de transmisión horizontal y vertical, a menos que se apliquen medidas para controlarla.

M. paratuberculosis es responsable de la enfermedad de Johne y se la responsabiliza también como etiología de la enfermedad de Crohn en humanos. En ciertos casos de dificultad para el cultivo de *M. paratuberculosis* se ha sugerido que formas deficientes de pared celular (CWD) serían una forma patogénica del microorganismo no cultivable en casos de humanos. No es claro si las formas CWD están presentes en los tejidos de animales con la enfermedad de Johne, por lo que se estudió en un ensayo de hibridación in situ de *M. paratuberculosis* con formas CWD, para determinar si las mismas estaban presentes en los tejidos de animal enfermos. Para ello se utilizaron tejidos bovinos y ovinos usando una sonda marcada del IS900 y los resultados de 6/10 animales infectados fueron positivos para *M. paratuberculosis* (60%SE), 4 intestinos y 2 linfonodos intestinales.

La identificación de la presencia de CWD en animales con PTBC puede explicar por qué *M. paratuberculosis* no es fácilmente aislado de algunos animales y/o por qué en las patologías similares a PTBC vista en los tejidos de

animales afectados no es cultivable. Las formas CWD pueden representar una alta forma evolucionada de supervivencia como la pérdida de la capa estructural externa de la bacteria que podría evadir la respuesta inmune del hospedador así como permitir la sobrevivencia dentro él.

CUADRO CLINICO Y LESIONES EN PTBC.

La PTBC es una enfermedad crónica que no se manifiesta clínicamente más que en una pequeña fracción de los animales infectados que desarrollan respuestas inmunes ineficientes o contraproducentes. Los primeros síntomas son de tipo inespecífico, pérdidas productivas y de peso y en muchos casos no dan lugar a otras manifestaciones ya que los animales son eliminados antes de que progrese la enfermedad.

Posteriormente se producen las manifestaciones clínicas clásicas de diarrea y mala condición general, que acaban con la muerte de los animales afectados. Éstos suelen ser adultos jóvenes de entre dos y cinco años, que aparecen enfermos de forma esporádica o concentrados en determinados momentos productivos o estacionales.

La PTBC se caracteriza 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. Para esta enfermedad **no existe tratamiento**. La diarrea profusa e incoercible típica que se encuentra en los bovinos no ocurre hasta etapas terminales, aunque la materia fecal pierde la forma característica y se torna blanda.

En la necropsia, en los casos más graves son evidentes los cambios relacionados con la consunción: caquexia, atrofia serosa y edemas. Las lesiones más específicas asientan en las porciones terminales del intestino delgado, donde se aprecia que la mucosa aparece engrosada y arrugada. Histológicamente, las lesiones son las de una inflamación granulomatosa que se localiza fundamentalmente en las zonas de tejido linfoide organizado intestinal (placas de Peyer, válvula ileocecal y ganglios linfáticos intestinales).

En la interacción bovino-bacteria y los mecanismos de enfermedad se acepta de forma generalizada que la entrada en el organismo de *M. paratuberculosis* se produce por vía oral y que la localización fundamental es el tejido linfoide del intestino delgado. Las bacterias entrarían por las células epiteliales que recubren las cúpulas de las placas de Peyer, de donde serían transferidas por MO a las zonas interfoliculares donde, en el caso de infecciones progresivas, comenzarían a desarrollarse granulomas que pueden quedarse localizados allí o expandirse al resto de la mucosa adyacente, en función de que el hospedador sea capaz de montar una respuesta inmune más o menos eficaz.

Estas diferencias de respuestas tienen su reflejo en la manifestación de lesiones, en los niveles de anticuerpos, en la respuesta inmune celular y en las cargas bacilares variables a lo largo del llamado espectro inmunopatológico, que se pueden resumir en cinco formas generales: focales, multifocales, difusas multibacilares, difusas linfocíticas y difusas intermedias (Tabla 1). Es importante resaltar que sólo las tres últimas son las que dan lugar a manifestaciones clínicas a partir del momento en que alcanzan una cierta extensión. La localización de cada animal infectado en alguno de los puntos de esta clasificación determinará el que pueda

esperarse una mejor o peor respuesta a cada una de las técnicas de diagnóstico disponibles y, en definitiva, el que se pueda detectar la enfermedad o no con ellas.

Finalmente, hay que señalar que, aunque no se conocen bien las causas que determinan que una infección paratuberculosa inicial evolucione en una dirección o en otra, se deduce que ello depende de factores de resistencia tales como la edad, que a su vez dependen de componentes genéticos y ambientales.

Las proporciones y especialización de los dos principales tipos celulares, células macrofágicas y células linfocíticas, así como la extensión del tejido afectado, varían en función de la forma inmunopatológica de cada caso.

La carga de micobacterias presentes en las lesiones también depende de la forma inmunopatológica y oscila desde la presencia masiva hasta la más extrema escasez. La localización más constante de las lesiones paratuberculosas, incluso de las más limitadas, es la válvula ileocecal y los ganglios linfáticos yeyunales caudales. Sin embargo, en las formas más extensas se pueden detectar lesiones no sólo en distintas regiones del intestino, sino también en otros órganos y tejidos, de entre los cuales el más comúnmente afectado es el hígado.

Tabla 1: Formas patológicas de la Paratuberculosis.

Paratuberculosis	Espectro inmunopatológico de las micobacterias
Formas o tipos focales en placa de Peyer	<ul style="list-style-type: none"> • Formas tuberculoides extremas. • Respuesta inmune celular y no humoral (o ausencia de ambas periféricamente). • Presencia muy escasa de micobacterias.
Formas o tipos multifocales	<ul style="list-style-type: none"> • Formas o tipos tuberculoides. • Respuesta inmune celular y ausencia o débil de la humoral. • Presencia escasa de micobacterias.
Formas difusas y graves	<ul style="list-style-type: none"> • Formas intermedias-lepromatosas • Respuesta inmune humoral intensa y ausencia o débil de celular.
1- Multibacilar	<ul style="list-style-type: none"> • Presencia de numerosas micobacterias • Formas intermedias-tuberculoides.
2- Linfocítica	<ul style="list-style-type: none"> • Respuesta inmune celular intensa y escasa o nula humoral. • Presencia escasa de micobacterias.
3- Intermedias	<ul style="list-style-type: none"> • Formas intermedias. • Respuesta inmune humoral y celular. • Presencia moderada de micobacterias.

NOTA: Las formas focales lepromatosas puras no han sido descritas en PTBC.

En pequeños rumiantes las lesiones se clasifican en cuatro categorías: **1)** Lesiones focales: pequeños granulomas en las placas de Peyer, con lesiones similares en los linfonódulos ileocecales. **2)** lesiones multibacilares difusas: enteritis granulomatosa difusa y granulomas, y focos de necrosis, con linfadenitis granulomatosa difusa o multifocal. **3)** lesiones linfocíticas difusas: los linfocitos fueron el componente principal infiltrado de la lámina propia y focos de necrosis con o sin calcificación. **4)** Lesiones mixtas difusas, con lesiones intermedias como las de formas multibacilar difusa y linfocítica difusa. Este abanico de lesiones puede estar reflejando el estado de la respuesta inmune. Las lesiones focales pueden representar el extremo tuberculoide del espectro inmunopatológico de las micobacteriosis. La forma linfocítica difusa puede corresponder a la forma tuberculoide intermedia. El tipo multibacilar difuso puede representar a la forma lepromatosa intermedia. El tipo mixto difuso podría encontrarse entre los dos intermedios. *M. paratuberculosis* puede ser cultivado a partir del 69% de los animales con lesiones difusas y del 44% de los que presentan lesiones focales.

En las ovejas se ha observado una fuerte relación entre los hallazgos patológicos y la respuesta inmune celular. La mayoría de los animales con lesiones focales y algunos con lesiones difusas responden en forma positiva a las pruebas de intradermorreacción e IFN- γ , mientras que aquéllos con lesiones difusas que contienen abundantes bacilos ácido resistentes son negativos. Los animales con lesiones difusas y signos clínicos son positivos a las pruebas serológicas y los que presentan lesiones focales y subclínicas son negativos. Así, los métodos basados en la inmunidad celular y los que detectan la inmunidad humoral son complementarios, ya que abarcan animales con diferentes aspectos patológicos.

Caracterización inmunopatológica de la enfermedad.

Mycobacterium paratuberculosis esta exquisitamente adaptado a sobrevivir en el huésped a pesar de las reacciones inmunes agresivas contra el mismo. Un rasgo común de las micobacterias incluyendo a *M. paratuberculosis* es que una vez que infecta a los macrófagos (MO), interfiere en su interior con la maduración del fagosoma evadiendo la primera línea de defensa del huésped contra patógenos bacterianos. El sistema inmune del huésped comienza un ataque intenso de los MO infectados con un rápido despliegue de los Linfocitos (L) como los denominados LT Gamma-Delta ($\gamma \delta$ -T), LT CD4 «helper» y LT CD8 «citotóxicos».

Estas células interactúan con los MO infectados y con cada una de las otras L involucradas en la respuesta inmune a través de una compleja red de citoquinas y receptores celulares. *M. paratuberculosis* persiste y el daño es transferido a las células epiteliales intestinales. El mejoramiento para controlar al patógeno radica en el entendimiento de cómo *M. paratuberculosis* interfiere con la respuesta defensiva de los MO. Los tipos de células del sistema inmune involucradas en la respuesta del huésped, las citoquinas de comunicación entre estas y los factores genéticos del huésped que controlan la infección, son los elementos a caracterizar para comprender mejor la etiopatogenia de la enfermedad.

La población de L de los linfonódulos mesentéricos y de las placas de Peyer del íleon y yeyuno es predominantemente del tipo LT CD4+/ $\gamma \delta$ en los dos primeros y del tipo



LT CD8+ en los últimos, confirmando el carácter celular LT de la respuesta. Se han observado células LT CD2+ en todos los GALT, probablemente reflejando el incremento de CD4+ y CD8+.

En estudios que caracterizaron fenotípicamente a MO en lesiones paratuberculosas en cabras, se observó que en el examen de aquellas lesiones de tipo subclínicas las mismas estuvieron principalmente localizadas en las áreas de las placas de Peyer del intestino delgado. Las lesiones consistieron en el acumulo de MO con abundante tinción a menudo con citoplasma vacuolado presencia de L y células gigantes multinucleadas. Los MO y las células gigantes con poco a moderado número de bacilos ZN positivos o tinción inmunohistoquímica positiva para Map. Los MO en las lesiones mostraron menor expresión de moléculas inmunes del tipo del complejo de histocompatibilidad (MHC) clase II, una molécula involucrada en la presentación antigénica, además de presencia de CD68, una glicoproteína asociada con las membranas lisosomales y de CD11b, una subunidad de complemento receptor 3 (CR3).

Resúmenes de algunos trabajos sobre Paratuberculosis realizados por nuestro grupo de investigación.

1. «Diagnóstico, Epidemiología y Programa de Control de la Paratuberculosis en Argentina».

PAOLICCHI, F.; MORSELLA, C.; VERNA, A.; SPATH, E.; ZUMARRAGA, M.; GIOFFRÉ, A.; ROMANO, M.; CATALDI, A. 7th International Colloquium on Paratuberculosis, 2002.

Desde 1980 se llevan a cabo en el INTA-FCA UNMdP tareas de diagnóstico e investigación en Paratuberculosis sobre serología, bacteriología e inmunopatología de la enfermedad en rumiantes. Entre los años 1992 y 2002 la técnica serológica de elección ha sido la prueba de ELISA indirecto absorbido con una sensibilidad de 66% y especificidad de 98% ajustada por ROC-MedCalc Program. Se han procesado un total de 67.990 sueros (61.180 bovinos y 6.670 cérvidos y 140 ovinos), mientras que un total de 9.123 muestras provenientes de relevamientos de bovinos de 4 años o más de las Provincias de: Buenos Aires (BA:n=3.160), La Pampa (LP:n=716), Corrientes (C:n=761), La Rioja (LR:n=101), Neuquén (N:n=74) y Río Negro (RN:n=385). Las seroprevalencias aparentes se ajustaron para obtener seroprevalencia real resultando en BA: 26,5% (carne) y 56% (leche), LP: 2,4%, C: 1%, LR: 0,2%, N:0%, RN: 7%. Desde 1985 se han procesado muestras de material fecal (MF), órganos (OR) o leche (L). Un total de 136 cepas de *Mycobacterium avium* subsp *paratuberculosis* (*M.ptbc*) fueron aisladas a partir de MF (n=100: 66 bovinos carne (bc), 28 bovinos leche (bl), 6 cérvidos (ce)), OR (n=34: 12 bc, 3 bl, 19 ce) y L (n=2 bl). Del total de cepas aisladas, 61 han sido tipificadas por RFLP en 4 patrones distintos designados «A» (75%), «B» (10%), «C» (6,1%) y «E» (13%), y comparados con aislamientos de Europa. El patrón más prevalente en Argentina ha sido idéntico al menos frecuente en Europa R9 (C17), mientras que los otros patrones no fueron hallados en Europa. Los cérvidos solo han demostrado poseer el patrón «A». Estos resultados demuestran la importante prevalencia de *Ptbc* en la Argentina y la de identificar rodeos enfermos para programar su control y erradicación.

2. «Distribution of IS900 restriction fragment length polymorphism types among animal mycobacterium avium subsp paratuberculosis isolates from Argentina and Europe».

PAOLICCHI, F.; MOREIRA, A.; MORSELLA, C.; ZUMARRAGA, M.; CATALDI, A.; BIGI, F.; ALITO, A.; OVERDIUM, P.; VAN SOOLINGEN, D.; ROMANO, M.

Paratuberculosis or Johne's disease is a chronic gastrointestinal tract infection of ruminants caused by *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* and may be associated with Chron's disease in human. *M. paratuberculosis* is considered a well conserved subspecies of *M. avium* being the only obligate pathogen within the *M. avium* complex, and this species contains the species-specific insertion sequence IS900. In Argentina a total of 2530 animal sera were obtained in eleven districts of Buenos Aires and La Pampa Provinces and were tested for antibodies against *M. paratuberculosis* using an indirect ELISA test, and the seroprevalence ranged from 2,5% to 51,5%. In the present study IS900 RFLP typing was applied in Argentina to *M. paratuberculosis* isolates from bovine and deer, and a comparison was made with isolates from Europe countries. Materials and methods: Sixty one *M. paratuberculosis* isolates from cattle and deer from Buenos Aires and La Pampa, Argentina, were used. All of these strains were identified as *M. paratuberculosis* on the basis of growth on Herrold's medium supplemented with mycobactin J and microscopic characteristics. Extraction of DNA was performed as described previously (van Soolingen, 1991) using approximately 1 µg of genomic DNA digested separately for three hours at 60°C with 5 U of BstEII and for one hour at 37°C with 5 U of PstI. IS900 probe a 217 bp fragment was obtained by PCR with oligonucleotides positioned at bp 662-640 and 445-467 of the IS900. This fragment is located left of the PstI site in IS900. The fragment of 217-bp was labeled with (γ-32P) dCTP using the Oligolabelling kit (Pharmacia Biotech). The membranes were prehybridized two hours at 65°C, hybridized overnight at 65°C with (γ-32P) dCTP labeled probe. Molecular weight markers used, were supercoiled ladder-PvuII, PhiX174-HaeIII and HindIII. The RFLP types of *M. paratuberculosis* isolates obtained in Argentina were compared with isolates present in the collection of RIVM Lab. The conditions used at the RIVM were identical at the INTA except the use of probe prepared by PCR using pMB22 as a target for amplification of the region 272-962 resulting in a product of 707 bp. After digestion using restriction endonuclease BstEII, the IS900-RFLP types from Argentine *M. paratuberculosis* isolates were arbitrarily designated by the letters A, B, C, and E. The European types were designated with R-types nomenclature used by the RIVM and second between bracket were designated with the corresponding C-types used by Collins et al (1990), Pavlik et al (1999). Results: Sixty-one BstEII digested *M. paratuberculosis* DNAs were hybridized with the 217-bp IS900 probe. Fourteen to sixteen fragments ranging from about 1.5-9 Kb in size were visualized. Four different types were distinguished and all highly similar. The majority of the *M. paratuberculosis* isolates, 46 (75%) represented type A. Type B, C and E were presented in 6 (10%), 1 (2%) and 7 (13%) of the isolated, respectively. All the deer isolates were Type A and cattle isolates represented all the RFLP types. Some of the isolates with different BstEII-IS900 types were also digested with PstI and no

differences were found using this other restriction enzyme. The most common type in Argentina (75% isolates) was identical to R9 (C17) from Europe, found in 4,7% of the isolates. The type B, C and E from Argentina did not match with the european type. The most common type from Europe C1 (59% isolates) followed by type C10 (20,1%) were not found in Argentina. Discussion: At present there are no data about typing *M.paratuberculosis* from South America. The most extensive work in typing *M.paratuberculosis* strains was done by Pavlik et al (1999) who analyzed 1008 strains mainly from Europe countries, with IS900-RFLP. In the present work the 4 different IS900 types were found in 61 *M.paratuberculosis* strains isolated in Argentina. They were compared with those isolates from the collection of RIVM Lab. The comparison revealed that only one type A was identical to R9 (C17) from Europe. However this type is not very frequent in Europe, type C17 was found in 4,7% of isolates by Pavlik et al (1999). We would expect to find the most common european type C1, reported by Pavlik et al (1999) in Argentine due to infected cows which were imported from Europe to Argentina in the past. In this work some of the isolates with different BstEII-IS900 types were also digested with PstI and no difference was found, but we used to hybridized one fragment of IS900 located in a region to the left of PstI restriction site at position 891 in the sequence published by other authors and we can not compare this result with the results of Pavlik that used the enter IS900 probe. The high prevalence of Paratuberculosis in Argentina, based on seroprevalence and feces culturing indicate that this is a widespread disease in our region which requires the implementation of a control program. The knowledge of genetic heterogeneity of *M.paratuberculosis* in infected herds from different areas could help to develop strategies for the epidemiological surveillance. These results demonstrate that the RFLP types and distribution of the different types found in Argentina are different from those in Europe and these finding could contribute to a better understanding of transmission.

3. Typing of Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis from isolations of feces and organs of red deer (Cervus elaphus).

VERNA, A; MORSELLA C; ZUMARRAGA, M; ROMANO, M; CATALDI, A.; PAOLICCHI, F. 7th International Colloquium Paratuberculosis, 2002.

It is important to develop the Polymerase Chain Reaction (P.C.R.), and the restriction fragments of longitude polymorphism (R.F.L.P.) technologies to identify genome segments since they constitute quick, sensitive, and specific methodologies for the detection of *Mycobacterium avium subsp. Paratuberculosis (M. paratuberculosis)*, a microorganism that produces animal paratuberculosis and that is related to Cronh's disease in humans.

OBJECTIVES: -To isolate *M. paratuberculosis* strains and to apply a P.C.R. protocol to confirm the IS900 insertion sequence. -To study by R.F.L.P the genetic pattern of the strains isolated. -To analyze cellular and extracellular proteins expressed in *M. paratuberculosis*.

Feces of deer were cultured in culture media Herrold-Yolk-Egg (HYE), with (HYEM) and without mycobactin, adding piruvate and antibiotics, for the isolation of *M. paratuberculosis*. The strains isolated were amplified by P.C.R. and studied by R.F.L.P. and Immunoblotting (IB). RESULTS : Twelve *M. paratuberculosis* strains, 6 from feces were isolated. The strains isolated developed only in HYEM medium, showing their characteristic

dependence to mycobactin. The P.C.R. analysis was positive for strains cultured from the tissues (n=6) and feces (n=3) of deer with clinical paratuberculosis (Figure 1). While amplification was achieved starting from strains isolated from tissues and feces, the P.C.R. was negative from direct feces. All the isolates revealed an identical R.F.L.P. pattern (Figure 2), with a 217-bp probe located to the right of the cut of the Bst E II endonuclease. All of the isolates analyzed from this deer farm possessed R.F.L.P. Bst E II «A» pattern. Immunoblotting detected 65 kDa (thermal shock), 42 kDa, 35 kDa, and 28 kDa protein antigens, from the bacterial extracts as well as directly from the tissues corresponding to such an isolate from an animal with clinical symptoms and characteristic lesions of paratuberculosis in the organs (Table 1 and Figure 3). The negative results of the immunoblotting of most of the strains cultured could be because the mycobacterial growth was not enough to detect the proteins. A single «A» genetic pattern was identified in the population studied. The IS900 sequence specific of *M. paratuberculosis* was amplified. The result was not successful when feces without previous isolation were used. Proteins excreted and contained in the bacterial soma of an animal were identified, but it is necessary to characterize *M. paratuberculosis* specific antigens better to increase the sensitivity of immunological tests.



# STRAINS	Isolated HYEM	ELISA	electroforetic RUNNING	
			cellular EXTRACT	SOBRENADANT
119	+	-	Negative	Negative
305	+	S	Lipids	Lipids
9618	+	+	Positive (Prot 65 KD)	Positive (Prot 65 KD)
9614	+	+	Negative	Negative
9619	+	+	Lipids	Lipids

Result of electroforetic running compare with the *M. paratuberculosis* isolated in HYEM media and serologic results in paratuberculosis infected deer.



PARATUBERCULOSIS: METODO DE DIAGNOSTICO Y PERSPECTIVAS DE CONTROL (PARTE 2)

Fernando Paolicchi

Grupo de Sanidad Animal, INTA
Profesor Adjunto, Área de Producción Animal,
Unidad Integrada
EEA INTA-Facultad Ciencias Agrarias, UNMDP.
CC 276, (7620) Balcarce,
Argentina.
E-mail: fpaolicchi@balcarce.inta.gov.ar

INTRODUCCION

La Paratuberculosis (PTBC) es una enfermedad crónica de los ruminantes, que causa pérdidas de producción y por ende económico a la ganadería bovina, ovina y de ciervos en producción. Cuando se observan en un rodeo o majada casos clínicos de PTBC (diarrea, pérdida de peso, emaciación progresiva), estos solo representan la parte visible del problema ya que habrá una proporción del rodeo que no presenta ningún signo clínico pero conviven junto a los enfermos los portadores subclínicos o inaparentes de la enfermedad.

Para el estado clínico de la PTBC no existen tratamientos de ningún tipo, quedando como único recurso, un diagnóstico rápido para su confirmación y la venta a frigorífico del animal. En general la enfermedad se presenta en animales adultos o en vaquillonas 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 la presentación de PTBC en jóvenes de 12 a 15 meses de edad, categoría de cervidos con una mayor susceptibilidad a la infección y con un grado de expresión de la enfermedad muy repentino.

La infección ocurre principalmente en los 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 *Mycobacterium avium subsp paratuberculosis (Map)* tienen una 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 contagiarse. Esto último es muy importante de tener en cuenta para la implementación de prácticas de manejo a utilizar para controlar la enfermedad.

Los rodeos lecheros con una prevalencia serológica menor del 5% probablemente no tengan pérdidas económicas, pero si la prevalencia es mayor es de esperar que ocurran pérdidas de producción sobre todo en la industria láctea. La PTBC subclínica produce una reducción en la producción de leche y acorta el periodo de vida útil de la vaca ya que además hay una mayor predisposición a las mastitis. En majadas donde la seroprevalencia es del orden del 10%-15% y se presentan casos clínicos, el porcentaje de ovinos infectados oscilaría entre el 40% y el 60%. En todos los casos hay una parte de la población infectada con PTBC silente y ante situaciones de estrés del animal o cambios bruscos en el medio ambiente provocan el paso de una fase latente a las formas clínicas.

La PTBC es una de las enfermedades infecciosas de los bovinos que más lentamente progresa, requiriendo un

considerable número de años desde que se instala en el rodeo hasta que se observan animales con signos. En rodeos cerrados con PTBC hay un incremento constante en el porcentaje de animales infectados con Map en la población. En rodeos abiertos se corre el riesgo de incorporar al mismo animales infectados de otros rodeos y para prevenir esto último se deberían analizar con un test como el ELISA a todos los animales comprados para determinar *a priori* el grado de infección antes de la incorporación al rodeo.

El control de la PTBC toma tiempo y requiere de cambios en el manejo para minimizar la probabilidad de infección de los terneros y detectar los adultos infectados por Map. Para el diagnóstico de laboratorio *in vivo* de la PTBC hoy en la practica se disponen de dos o tres métodos básicos:

- Detección de anticuerpos humorales por ELISA o inmunodifusión (IDA),
- Cultivo de materia fecal (MF) o leche (L) en medios específicos,
- Detección de gamma interferón o el uso del PCR (mas extraordinariamente).

Aunque no existe una metodología de diagnóstico *in vivo* 100% sensible y específica se ha avanzado mucho en este aspecto. El ELISA que se aplica sobre suero sanguíneo, detecta principalmente animales clínica y subclínicamente infectados, con una sensibilidad entre el 60-70% y una especificidad del 90-95%. Es por este último concepto que se requiere de dos muestreos complementarios de aquellos animales que fueron negativos, a mitad del programa de control y antes de finalizar el mismo para minimizar los errores propios de la técnica.

El ELISA solo se aplica a animales adultos (de tres o más años de edad), porque la respuesta humoral en PTBC es más tardía que la celular, por lo tanto en animales jóvenes su uso provoca más falsos negativos. El cultivo, aunque es 100% específico porque no produce falsos positivos, tiene como desventaja el mayor tiempo y el costo mas elevado. Por otra parte, el aislamiento de Map generalmente se logra en estadios avanzados de la enfermedad, ya que en los estadios tempranos o en los portadores subclínicos la eliminación por MF no ocurre o es intermitente y con una baja concentración de microorganismos y por lo tanto la posibilidad de detectar cultivos positivos es considerablemente menor.

Desde 1985 se llevan a cabo trabajos de investigación sobre PTBC en el INTA Balcarce de Argentina. En una primera etapa se pusieron a punto técnicas serológicas y bacteriológicas necesarias para realizar un diagnóstico confiable; luego se aplicaron estas técnicas para promover el control voluntario de la PTBC en establecimientos piloto y para realizar una caracterización poblacional de la situación de la PTBC en distintos sistemas de producción y regiones del país. Estos trabajos permitieron reconocer la amplia difusión de la PTBC en el ganado bovino de la zona pampeana, especialmente en rodeos lecheros y en rodeos de carne donde la producción se intensificó en los últimos años. Asimismo se reconoció a la PTBC como una enfermedad de impacto económico en la cría de cervidos en cautiverio, adquirida posiblemente por contacto con bovinos.

DIAGNOSTICO DE LA PTBC

Como en otras enfermedades infecciosas donde existe el estado de portador, la PTBC se presenta en forma de «iceberg», donde lo que se ve al identificar clínicamente un animal enfermo es sólo una pequeña parte del problema. Se estima que por cada animal clínicamente enfermo hay al menos entre 10 y 15 bovinos más con la infección subclínica, dependiendo de la prevalencia en el rodeo. Por lo tanto, en un rodeo infectado con PTBC, los animales podrían ser clasificados en cuatro estados de la siguiente forma:

● Estado IV: Animales **infectados y clínicamente enfermos**,

● Estado III: Animales **infectados asintomáticos**, pero que diseminan la bacteria al excretarla por la MF o la leche,

● Estado II: Animales **infectados** que no son identificados por las técnicas diagnósticas (falsos negativos),

● Estado I: Animales **no infectados (sanos)**.

Si únicamente se elimina el animal que muestra la enfermedad clínica (Estado IV), se está haciendo poco para controlar el problema a nivel de rodeo. La enfermedad clínica no es un buen indicador de la prevalencia de la enfermedad, ya que se han registrado establecimientos con 60% de prevalencia serológica sin que se hayan observado casos clínicos dentro del rodeo.

Las pruebas diagnósticas son de utilidad para ayudar a los productores a tomar decisiones para arribar al control de la enfermedad. Ninguna prueba sola es suficiente para todos los propósitos y la decisión de la aplicación de más de una para confirmar la presencia de animales sospechosos y la implementación de métodos de manejo y eliminación de animales, deberá ser cuidadosamente analizada en el contexto del costo beneficio de la aplicación.

De acuerdo con los modernos enfoques de la medicina veterinaria en producción animal, además del diagnóstico y de la exactitud de las técnicas usadas, otros factores deben ser considerados en la formulación de un programa racional de control de la PTBC como son las medidas de manejo. Nuevas pruebas diagnósticas y hallazgos sobre la epidemiología de la PTBC han hecho posible intervenir con una relación costo-beneficio favorable para detener gradualmente la diseminación de la infección.

HERRAMIENTAS PARA DIAGNOSTICAR LA PTBC

El diagnóstico de PTBC puede realizarse mediante:

● Diagnóstico clínico individual y epidemiológico de rodeo,

● Anatomopatológico por diagnóstico macroscópico de lesiones a la necropsia, caracterización histológica de lesiones granulomatosas,

● Bacteriológico por cultivo del microorganismo desde MF, leche o semen,

● Inmunidad Celular por determinación de Gamma Interferón en sangre/plasma o intradermoreacción con antígenos proteicos derivados de *Mycobacterium avium*,

● Inmunidad Humoral por diagnóstico serológico de anticuerpos en suero por la técnica de ELISA o IDA,

● Diagnóstico Molecular por detección de una porción específica del genoma (IS900) de la bacteria mediante PCR (polymerase chain reaction).

Cada prueba presenta sus ventajas y desventajas entre

las cuales se incluyen los costos, complejidad y tiempos de realización. La elección de la prueba depende del número de animales (un individuo, un rodeo o poblaciones mayores) y del objetivo del diagnóstico (diferencial individual, caracterización de la situación, monitoreo de un programa de control).

Diagnóstico Serológico

El diagnóstico serológico de la PTBC se puede aplicar sólo en bovinos adultos, en general a partir de los 30 meses de edad. Por otra parte, es mayor la certeza del diagnóstico cuando el animal manifiesta signos clínicos, es decir presenta diarrea y edema submandibular. Generalmente existe una correlación positiva entre la detección del mayor título serológico en ELISA y mayor excreción del bacilo por MF. Sin embargo como dijimos antes, la edad de ocurrencia clínica de la enfermedad ha disminuído y esto está relacionado con el nivel de infección del rodeo y con el nivel de intensificación de las explotaciones ganaderas (alta carga animal, alta producción lechera, entre otros).

Para la detección de PTBC en ovinos tanto IDA y ELISA son valiosos y ambos detectan diferentes subpoblaciones de ovejas infectadas, observándose una mayor especificidad con IDA (99-100% especificidad y 38-56% sensibilidad) mientras que ELISA presenta valores de especificidad y sensibilidad similares (98,2-99,5% y 35-54% respectivamente) al IDA.

En la Universidad de Wisconsin (USA), se ha evaluado el uso de una herramienta para el criterio de interpretación de enfermedad de rodeo denominada Likelihood Ratio (LR), obtenida a partir de distintos valores arrojados por la prueba de ELISA (relación S/P), donde se utiliza un criterio amplio en la interpretación de los resultados de valores individuales obtenidos con el uso de un ELISA comercial. De esta forma la relación S/P se interpreta categorizando a los bovinos en 5 estados que se incrementan desde el animal negativo (no detección de anticuerpos) pasando por el estado de sospechoso hasta el fuertemente positivo (estado avanzado de la infección e inminente enfermedad clínica).

EL PROBLEMA DEL DIAGNOSTICO INDIVIDUAL EN RODEOS INFECTADOS

Cuando se presenta un animal de alto valor económico con sospecha de PTBC, contamos -además de la inspección clínica- con las técnicas de diagnóstico de laboratorio descriptas previamente. Podemos aplicar algunas o todas ellas para tener una alta probabilidad de descartar el diagnóstico de sospecha de PTBC, siendo la única limitante el costo y el tiempo.

Cuando el problema se presenta en rodeos generales de gran tamaño, el diagnóstico se constituye en un problema de decisión económica de relevancia. Por lo tanto se requiere analizar brevemente algunos conceptos sobre las características de las técnicas de diagnóstico y cómo se pueden usar ajustadas a las necesidades de quien toma decisiones sobre eliminación o descarte de animales enfermos.

La exactitud de una prueba diagnóstica es la capacidad de dar un resultado verdadero sobre el estado de enfermedad de un individuo o una población en estudio. La exactitud se compone de dos características: la sensibilidad (Se) y la especificidad (Sp) diagnóstica. La Se es la probabilidad de dar un resultado positivo en una muestra de un animal infectado/enfermo, mientras que la Sp es la probabilidad de dar un resultado negativo en una mues-



tra de un animal no infectado/enfermo.

El ELISA indirecto utilizado en nuestro laboratorio presenta una Se del 66% y una Sp del 95,4%. Esto significa que de cada 100 individuos infectados, detecta 66 y que de cada 100 individuos considerados negativos (falsos negativos) hay 5 infectados. Estos valores son considerados promedios ya que varían si el animal está clínicamente enfermo (la Se aproxima al 85%) o si es un portador asintomático (la Se aproxima al 45%).

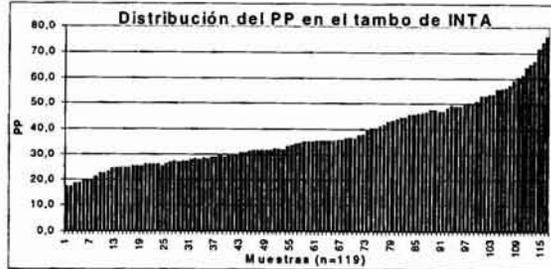
La capacidad de un test para discriminar un individuo o población sana de otra enferma depende de la determinación de un punto de corte (cut-off) realizado sobre la base del estudio en una población verdaderamente sana y otra verdaderamente enferma. Los resultados se pueden verificar por el análisis de la curva denominada ROC (*Receiver Operating Characteristic*), un gráfico que traza el porcentaje de verdaderos positivos en función del porcentaje de falsos positivos con diferentes puntos de corte. Además calcula el valor de corte que tiene la mayor exactitud, es decir el que minimiza los resultados falsos negativos y falsos positivos (Ver resumen al final: «**Ajuste del punto de corte (cut-off) del ELISA para Paratuberculosis Bovina con sueros controles locales**»).

Los kits de ELISA comerciales para diagnóstico de PTBC son importados y ellos sugieren la aplicación de un punto de corte -para diferenciar animales positivos de los negativos- que ha sido obtenido en poblaciones bovinas de otros países. En nuestro laboratorio hemos probado dos diferentes kits de ELISA importados, los que en forma preliminar arrojaron una Se no mayor al 50% utilizando para ello sueros de animales enfermos o asintomáticos pero todos con cultivo positivo de Map en MF o leche, resultado que es coincidente con lo informado por otros autores. De esta manera, estos ELISA comerciales no parecen por ahora demostrar ninguna ventaja diagnóstica respecto al ajustado y utilizado rutinariamente en INTA Balcarce.

De manera constante, en nuestro laboratorio continuamos definiendo un cut off obtenido localmente para nuestra región en función de sueros bovinos verdaderamente positivos (ELISA y cultivo positivos) y sueros de animales negativos de Argentina. Los positivos de referencia son sueros de animales enfermos o subclínicamente infectados pero con aislamiento de Map desde la MF o leche y pertenecientes a rodeos de las Provincias de Buenos Aires, Santa Fe y Córdoba, mientras que los sueros negativos pertenecen a bovinos de Tierra del Fuego donde no se ha diagnosticado la enfermedad y se considera como una región libre dentro del país. El análisis de

la curva ROC producida con el resultado del análisis ELISA de estos sueros, permitió contar con un cutt off local que se irá mejorando con el aumento del número de muestras de animales positivos.

Fig.1. Ejemplo del Porcentaje de Positividad (PP) en un estudio preliminar serológico utilizando ELISA en un establecimiento donde se desconoce el estatus de PTBC bovina.



Los resultados de ELISA de una muestra grande de un rodeo problema (o del rodeo completo) se pueden graficar para observar la distribución de los resultados individuales (Figura 1). Esto permite priorizar la eliminación de bovinos positivos comenzando con los individuos que tienen los valores de ELISA más elevados por encima del punto de corte positivo y además de ser seroreactores presentan otra característica no deseable desde el punto de vista productivo o sanitario (menor producción, presencia de pietín o de mastitis, baja calidad genética, mala conformación, entre otras). Esto puede constituir una respuesta práctica a los problemas de toma de decisiones del veterinario o de productor.

En general se debe considerar que la probabilidad de que una prueba como ELISA refleje el verdadero estatus del animal positivo depende de la prevalencia de PTBC en el rodeo. Esto indica que las herramientas de diagnóstico deberían ser utilizadas en el contexto de otra información sobre el riesgo de infección. Como ejemplo usando un ELISA comercial, en un estado de baja prevalencia de PTBC en el rodeo (1%) habría entre un 15% a 20% de posibilidad de que un resultado positivo en ELISA sea correcto, mientras que hasta un 99% de que un ELISA negativo sea correcto. Por el contrario, en una alta prevalencia (30%) habría alrededor de un 90% de posibilidad de que el resultado del ELISA sea correcto y un 75% a 80% de que el negativo sea correcto. El ELISA debería ser usado como diagnóstico de rodeo y no es recomendado para diagnóstico individual, aunque si la

En terminos generales el siguiente cuadro podría explicar en función de las diferentes prevalencias encontradas en un rodeo, cual sería la probabilidad de resultados con ELISA y cultivo de MF.

Posible % de Infección PTBC	Probabilidad ELISA + verdadero	Probabilidad ELISA - verdadero	Probabilidad Cultivo MF +	Probabilidad Cultivo MF -
1%	15%	99%	100%	99%
10%	67%	92%	100%	94%
+ 20%	+ 82%	84%	100%	85%
+ 50%	95%	57%	100%	63%

Fuente: C.Rossiter and D.Hansen, from National Johne's Working Group.



muestra proviene de un animal de rodeo infectado este podría ser acompañado por cultivo de MF para confirmar la infección y una repetición de ELISA pasados los 3 o 4 meses si el diagnóstico por cultivo es negativo.

Para la estimación de la prevalencia en nuestro rodeo se podría usar la fórmula siguiente:

$$P = \frac{[PE + (Sp - 1)]}{[Se + (Sp - 1)]}$$

donde P es prevalencia verdadera, PE prevalencia según la Prueba (en este caso ELISA), Se sensibilidad y Sp especificidad. Por ejemplo, usando ELISA (con Se de 25% y Sp de 98%) tenemos una prevalencia del 5%, la prevalencia calculada

$P = [0.05 + (0.98 - 1)] / [0.25 + (0.98 - 1)] = 0.13$ y por lo tanto sería del 13%.

OTRAS TÉCNICAS DE DIAGNÓSTICO

Si en un rodeo o majada el estatus de PTBC no está confirmado pero se observan animales casos de diarrea intermitente con pérdida de peso y mal estado general, entonces existen razones para pensar de que PTBC puede ser la causa.

-Tinción con Ziehl Neelsen: La observación microscópica de un frotis de materia fecal, tiene una Se y Sp 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 desde los tejidos afectados con lesiones macroscópicas, por ejemplo improntas de linfonódulos con tejido proliferativo o de intestino edematizado y engrosado) es de mucha utilidad en casos de PTBC y claramente visible las micobacterias dentro de los macrófagos residentes en la lesión.

-Cultivo: La prueba denominada «gold standard» (Prueba de Oro) es el cultivo y aislamiento de Map desde MF, leche, semen o desde los tejidos afectados. El cultivo de la bacteria es difícil ya que su lento desarrollo (entre 2 y 4 meses) se realiza sobre medios especiales con agregado de compuestos imprescindibles para su crecimiento y adicionados con antibióticos. La identificación de la bacteria se realiza por la morfología colonial, la positividad frente a la tinción con Ziehl Neelsen, su crecimiento lento y la dependencia a la micobactina «J» usada como cofactor de crecimiento exclusivo en Map en medios de cultivo como el Herrold.

A pesar de la importancia del cultivo, no existe estandarización de los métodos utilizados mundialmente y los laboratorios varían en su capacidad para la detección de Map. Durante el 2002 nuestro laboratorio participó en una prueba mundial de proficiencia de cultivo de Map, desarrollada desde el centro de referencia en PTBC de la Universidad de Pensylvania, USA, para lo cual se sometieron más de 30 laboratorios para demostrar la utilidad de los medios de cultivo, métodos de decontaminación y eficiencia en la detección de Map, demostrando que estos podrían ser ajustados a fin de unificar los métodos de cultivo.

Existen alternativas al cultivo individual, realizando «pooles» de MF de 5-6 vacas, donde los costos del mismo bajan sustancialmente el costo de un monocultivo. El cultivo debería ser usado para confirmar la infección en animales ELISA positivos en algunas de las siguientes circunstancias: a) ninguna evidencia clínica, b) prevalencia incierta, c) costo muy alto de eliminar un animal positivo y, d) inserción de un establecimiento en un Progra-

ma de Control Voluntario de PTBC.

-Prueba de Gamma Interferón: El test de gamma interferón es una prueba que detecta infección temprana ya que identifica una citoquina liberada por los linfocitos en el plasma sanguíneo. Esta prueba detecta animales con infección reciente ya que la primera respuesta a la misma es desarrollada por células linfoides (linfocitos T) que liberan gamma interferón. Según los ensayos previos la prueba es útil sobre bovinos jóvenes recientemente infectados y que aún no han desarrollado anticuerpos séricos dependientes de linfocitos B. Según las pruebas realizadas en INTA y que no han sido evaluadas en profundidad, la interpretación de un animal positivo dentro del rodeo no es fácil, ya que se debe realizar paralelamente con el diagnóstico de la infección por Tuberculosis y por lo tanto diferenciar al mismo tiempo ambas respuestas en el mismo test.

-Pruebas Moleculares: El Map presenta un pequeño, específico y repetitivo sector en su genoma denominado secuencia de inserción (IS900) que es utilizado por la Reacción en Cadena de la Polimerasa y es la base de un diagnóstico de laboratorio denominado (PCR), que presenta alta Sp y gran Se. A pesar de esta característica, esta técnica presenta algunas dificultades porque tanto la MF como la leche contienen algunas sustancias inhibitorias que hacen más compleja la reacción y por lo tanto la detección del antígeno puede dar falsos negativos.

La diferencia genética más evidente, encontrada hasta el presente, entre Map y *Mycobacterium avium subsp avium* es la presencia de una secuencia de inserción (IS900) en Map que estaría ausente en *M. avium*. Por lo tanto la técnica de PCR utilizando cebadores dirigidos a la secuencia de inserción IS900 sirve para confirmar que las micobacterias que desarrollaron en cultivo son Map y adicionalmente para detectar Map en el medio de cultivo antes de que pueda visualizarse macroscópicamente las colonias acortando de esta forma el tiempo de cultivo y del diagnóstico. Aun existen dificultades para la detección por PCR directa en las muestras de MF y leche, debido a la presencia de inhibidores en estas muestras clínicas. Los parámetros a optimizar para llegar a una PCR de alta Se son la elección de los cebadores, de las condiciones de amplificación y el disponer de un método eficaz de lisis de la bacteria que libere la mayor cantidad posible de DNA, así como asociar la PCR con estrategias que permitan eliminar inhibidores de las muestras clínicas. La aplicación de captura previa ya sea del bacilo con anticuerpos o de los sectores amplificados con oligos específicos, son estrategias que podrían aplicarse para mejorar la sensibilidad en la detección cuando se trabaja con muestras con alta cantidad de inhibidores como los que contienen la leche y la MF.

Debido al incremento en los casos clínicos y la alta seroprevalencia observada y a la posible naturaleza zoonótica de esta enfermedad, es necesario implementar un programa de control de esta enfermedad. Para esto es necesario evaluar las diferentes técnicas para diagnóstico de PTBC, especialmente en animales con sintomatología clínica leve y casos subclínicos. Además, para evitar que estas enfermedades vuelvan a entrar a un rodeo una vez que se ha alcanzado el estado de libre es necesario medidas de vigilancia epidemiológica. Con este fin una herramienta es la epidemiología molecular de Map, la cual comprende desarrollo de técnicas de biología molecular que nos permitieran la diferenciación de aislamientos y de esta forma conocer si la enfermedad se origina por transmisión desde otras regiones geo-



gráficas así como identificar rutas de infección entre bovinos y posibles reservorios. Al presente esta diferenciación de aislamientos de Map se realiza utilizando una técnica denominada RFLP basada en el segmento IS900. Un trabajo realizado en Argentina utilizando RFLP y usando como sonda la secuencia de inserción IS900, indicó que el 75% de los aislamientos en Argentina tienen el mismo patrón de RFLP. La secuenciación completa del genoma de Map, la cual ya está finalizada y disponible, sin duda permitirá conocer más del polimorfismo en el genoma de esta especie para introducir nuevas formas de tipificación, diagnóstico y de control de la infección. En algunos trabajos previos, se estudió la diversidad molecular de cepas aisladas de humanos y animales para identificar marcadores moleculares específicos de la enfermedad que sirvan para el diagnóstico, la prevención y el control de la enfermedad. El análisis por PCR Multiplex utilizado reveló que el 78% de los aislamientos de bovinos se agrupo, mientras que los aislamientos de humanos y ovinos no se agruparon y mostraron mayor diversidad genética. Las cepas ovinas y bovinas de la misma región geográfica fueron más estrechamente relacionadas que aquellas cepas de diferentes regiones sugiriendo que algunas cepas de Map son compartidas por ambas especies animales.

De esta forma es altamente deseable conocer la variabilidad de Map para comprender la epidemiología de las infecciones, su distribución y prevalencia, por lo tanto la identificación de otros genes diferentes es deseable para identificar Map con mayor especificidad. Recientemente un nuevo segmento IS110 fue identificado en cepas de Map, el denominado ISMap1 se presenta en 3 repeticiones con genes altamente conservados y estaría presente en cepas de Map pero no en otras micobacterias examinadas incluyendo a 10 cepas de *M. avium*. Este nuevo elemento de diagnóstico usado en combinación con la detección del IS900, podría ser muy valioso para clasificar cepas de Map.

-Intradermoreacción: ha sido ampliamente usada con antígenos proteicos de *M. avium* o de Map (Johnina) inoculando la tabla del cuello en bovinos o el pliegue interno del muslo en rumiantes menores. Sin embargo la Se y Sp son bajas para ser usadas en programas de control, aunque se ha mejorado por modificación de la técnica inoculando el antígeno intravenoso y determinando la respuesta serológica o alteraciones febriles.

ES LA PTBC UNA ZONOSIS ?

La enteritis granulomatosa provocada por Map en los bovinos posee una sorprendente similitud a una enfermedad similar vista en pacientes humanos denominada Enfermedad de Crohn y por lo tanto se ha sugerido que la PTBC podría ser una zoonosis. El Map es excretado por la leche de vacas infectadas y presentaría cierta tolerancia térmica al tratamiento de la leche pudiendo sobrevivir a la pasteurización permaneciendo en la leche envasada que se destina a consumo humano.

En algunos trabajos realizados en Europa con leche bovina de consumo obtenida en supermercados, fueron identificadas cepas de Map con la consiguiente declaración de riesgo sobre el consumo de leches pasteurizadas provenientes de tambos infectados. Recientemente en nuestro país hemos probado experimentalmente la eficiencia de un pasteurizador de leche para terneros de fabricación nacional, el que demostró en resultados preliminares ser efectivo, ya que que la leche infectada artificialmente con Map y pasteurizada durante 15 se-

gundos o 30 segundos a 73,5 grados C de temperatura queda negativa al cultivo posterior. La fuerte convicción de que la enfermedad en los humanos es consecuencia de la infección con Map ha llevado a ciertos países de la Unión Europea a solicitar la importación de productos lácteos de rodeos libres de PTBC y al desarrollo de proyectos conjuntos de investigación en esta área.

Pautas de manejo para el control de la PTBC en un rodeo.

El INTA Balcarce ha propuesto un modelo de control de PTBC que ha sido adoptado de manera voluntaria por algunos productores con resultados alentadores en varios establecimientos lecheros y de cría dentro de la Provincia de Buenos Aires y Santa Fé. Este modelo está basado en la experiencia propia y la de otros países en este tema y en las características propias de nuestros sistemas de producción. Algunas pautas preventivas y de manejo se resumen a continuación:

- Los terneros nacidos de madres positivas son susceptibles de contraer la enfermedad ya que en la leche se excretan micobacterias que son ingeridas diariamente y cuanto mayor tiempo ingieran esa leche mayor posibilidad de contraerla. En el calostro también hay micobacterias y por lo tanto existe un riesgo, aunque mínimo, de contagio a los terneros durante los primeros días de nacido.
- El uso de sustituto lácteo para alimentar los terneros en el tambo disminuye la probabilidad de infección a los terneros. El uso de un pasteurizador para tratar la leche destinada a la alimentación de terneros en las guacheras podría ser útil, siempre y cuando se asegure que el proceso de pasteurización aplicado elimine a Map.
- Cuando se producen muchos casos clínicos en vaquillonas, existe probablemente una alta exposición a materia fecal infectante o de leche de madres positivas que contagian a las terneras destinadas a reposición.
- Siempre se deben reponer las hembras de un rodeo con «terneras hijas de vacas negativas».
- Determinar la tasa de infección en el rodeo con una técnica serológica como ELISA es deseable y la prueba de elección para bovinos, ovinos y ciervos.
- Todos los animales con resultado sospechoso a ELISA deberán re-analizarse unos 6 meses después, ya que pueden ser animales infectados a punto de enfermarse y ser diseminadores de la enfermedad.
- La mejor forma de medir la tasa de infección de un rodeo es mediante el uso de una prueba de diagnóstico objetiva. Todos los adultos del rodeo deben ser sometidos tanto a la técnica de ELISA o concomitantemente al cultivo de MF. Ambos tendrían una Se aproximada al 60% para detectar infecciones subclínicas, en consecuencia si el 5% de un rodeo resulta positivo (prevalencia aparente) se debe asumir que el doble de las vacas en ese rodeo están efectivamente infectadas (prevalencia verdadera). Cuando ELISA y cultivo se aplican juntos la Se aumenta, ya que en nuestro laboratorio detectamos al menos entre un 12% a 15% de los animales seronegativos como positivos al cultivo y por tanto infectados.
- Los animales positivos por alguna prueba diagnóstica deberían eliminarse enviándolos al frigorífico o bien manejándolos eventualmente y por un periodo corto en un rodeo aparte (sucio) y sus hijas no deben usarse para la reposición pero podrían destinarse a la invernada.
- En un campo infectado, los potreros muy contaminados con aguas estancadas no deben usarse para pastoreo con animales susceptibles. Los animales jóvenes (terneros, corderos y bambis) deberían ser destinados a



potreros con pasturas nuevas y evitar el manejo junto con los adultos.

- Los bovinos que ingresen a cualquier establecimiento deberían tener diagnóstico negativo de PTBC o bien provenir de establecimientos libres de la enfermedad al menos con 4 años de anterioridad a la compra.
- Cualquier programa de trabajo para diagnóstico y control de PTBC debe extenderse al menos 5 o 6 años de aplicación continua, pues sino el abandono por un tiempo determinado volvera a subir la prevalencia de la enfermedad echando por tierra todo esfuerzo previo realizado.

BASE DE UN PROGRAMA DE CONTROL Y POSTERIOR ERRADICACION DE PTBC EN BOVINOS

1. Crianza de los terneros

La buena calidad general de la crianza de terneros minimiza la transmisión de Map, además de otros problemas sanitarios comunes a los terneros. Sin embargo no es posible la separación inmediata de los terneros de sus madres y por lo tanto todo animal nacido de una madre positiva nunca debe ser reingresado al rodeo como reposición.

2. Uso de pruebas de diagnóstico y eliminación de los positivos.

Todo programa de control de PTBC debe usar métodos de diagnóstico de laboratorio para identificar y eliminar las vacas infectadas de un rodeo, en particular aquellas que excretan Map en su MF o leche. Los bovinos infectados con PTBC excretan millones de micobacterias diariamente que permanecen viables aproximadamente un año, dependiendo de las condiciones ambientales, siendo estas áreas contaminadas la fuente más común de infección para los terneros y también para adultos. Los bovinos que excretan Map por MF se encuentran en los estados más avanzados de la enfermedad, pueden además transmitir la infección a sus terneros en útero o a través de su leche. El cultivo que implementamos de rutina en nuestro laboratorio y las técnicas de mayor sofisticación como el PCR, son técnicas útiles para detectar los excretores de mayor peligro de infección y ocasionalmente identificar algunos animales no detectados por las pruebas serológicas. La prueba de ELISA es de bajo costo y la de mayor exactitud de las pruebas serológicas. Muchos, aunque no todos los animales que excretan Map serán positivos al ELISA, con lo cual se puede medir la prevalencia de PTBC y comenzar a eliminar los animales que resulten positivos. El uso de ELISA más el cultivo de MF detecta la mayor cantidad de vacas infectadas. Las pruebas pueden ser efectuadas al mismo tiempo o alternativamente. Los resultados de ELISA se pueden cuantificar mediante la aplicación de un ranking denominado PP (Porcentaje de Positividad) teniendo en cuenta que los animales más positivos del rodeo son los más enfermos y de mayor eliminación de micobacterias al medio. La confirmación de resultados negativos en un animal o en el rodeo requiere de repetidos resultados negativos de los test aplicados.

3. Saneamiento del establecimiento.

Después que el riesgo de la transmisión de la PTBC a los terneros y recria se ha minimizado, otras vías potenciales de transmisión de Map deberán ser vigiladas y corregidas. Una fuente potencial de transmisión de Map es el agua de bebida contaminada con materia fecal del rodeo adulto infectado o enfermo. Aunque los adultos se consideran resistentes a la infección con Map, dosis al-

tas y frecuentes pueden causar infección y enfermedad en un cierto porcentaje del rodeo de vacas.

4. Chequeo de los bovinos comprados para ingreso al rodeo.

Antes de comprar bovinos de reemplazo deberían ser sometidos a la prueba de ELISA y si fuese posible conocer su origen, estos deberían provenir de rodeos negativos a PTBC. Un programa de control de PTBC debe evitar la reintroducción de la infección, ya que el riesgo de comprar vacas infectadas con Map es aproximadamente de 1:10. La vacunación de los bovinos contra PTBC no es una medida recomendada en países donde se la ha practicado, ya que es de valor limitado en el control de infecciones a Map e interfiere con el uso de pruebas serológicas en un rodeo y puede interferir con el diagnóstico de TBC.

Esta enfermedad emergente de los bovinos merece atención para un futuro próximo, ya que el éxito que se logre con la progresiva erradicación de TBC en bovinos dejará a una mayor población susceptible y sin competencia con otra micobacteria para que la PTBC se difunda y aumente la prevalencia. La prevención, diagnóstico adecuado y el control son herramientas que debemos tener a mano para ese momento.

EXPERIENCIAS DE VACUNACION EN PTBC

Las primeras vacunaciones se realizaron en Francia en 1926 aplicando bacilos atenuados y el seguimiento de los animales puso de manifiesto la disminución de la incidencia clínica. Actualmente es utilizada en programas de control en Francia, Dinamarca, Reino Unido y Holanda. La mayor experiencia se ha obtenido con la vacunación en ovinos, donde ha conseguido controlar la difusión en países como Islandia donde la enfermedad se amplifica con la introducción de animales infectados. El efecto beneficioso ha sido comprobado mediante experimentos de vacunación e infección en estudios de campo. Dentro de los más importantes efectos esta la disminución de la excreción de Map y la modificación del curso de la enfermedad a formas más leves. La vacunación con inmunógenos inactivados es aplicada en la zona pectoral en única dosis, dentro del primer mes de vida de corderos y terneros o también en animales de 4 a 6 meses de edad para aumentar la respuesta inmune, evitar la infección o diseminación si es que los animales ya están infectados. Sin embargo no confiere una protección absoluta y además en un cierto porcentaje se forman nódulos fibrocáseos y la respuesta serológica por ELISA es alta y duradera similarmente a la respuesta inmune celular midiendo producción de gamma interferón. Solo la PCR o el cultivo de MF podría discriminar entre vacunados e infectados con Map y sería aplicable en rodeos donde la prevalencia de infección por PTBC es extremadamente alta.

CONSIDERACIONES FINALES

-La PTBC debe ser manejada como un problema sanitario del rodeo y no como una enfermedad de un animal.

-La PTBC es una enfermedad infecciosa crónica y el grado de infección aumenta progresivamente con el tiempo, a menos que se aplique un programa de control.

-La PTBC en rodeos lecheros disminuye la producción de leche de las vacas con infección subclínica a partir de la primera lactancia y acorta la vida productiva de los vacunos. El mismo concepto es aplicado a la pro-



ducción en majadas y rodeos de ciervos infectados con Map.

-El control de PTBC lleva tiempo y requiere cambios de manejo para cortar la cadena de transmisión y minimizar las chances de infectar terneros. Eliminar solamente los animales clínicamente enfermos con PTBC no es suficiente para controlar la diseminación de la infección.

-La PTBC es una enfermedad de progreso muy lento. Debe transcurrir un número considerable de años para que la enfermedad clínica se haga evidente, después de la introducción de la infección en un rodeo. Igualmente toma un período de alrededor de 5 a 6 años erradicar la infección, dependiendo de las medidas sanitarias adoptadas y la prevalencia inicial.

-Los criadores de bovinos de pedigrí que proveen de animales a otros rodeos, tienen la obligación de impedir la transmisión de PTBC, cuidando que los futuros animales reproductores no estén infectados y desarrollen más adelante la enfermedad. El agente etiológico de la PTBC ha sido aislado del semen congelado de toros utilizados para iseminación artificial y además de toros provenientes de cabañas. Los toros infectados son frecuentemente responsables de la introducción de PTBC al rodeo, aunque no se conoce bien si es por el semen o por simple diseminación fecal. Esencialmente cada rodeo que se infecta con Map lo hace por la compra de vacas o toros infectados y por lo tanto cada rodeo de pedigrí o ganado que se venda para reposición debe estar libre de la infección, para el beneficio sanitario del país. Además se debe tener presente que los embriones seleccionados para ser transferidos a vacas receptoras deberían provenir de vacas con serodiagnóstico de PTBC negativo para evitar el riesgo de infección y estar procesados con los lavados según las normas internacionales (IETS) para asegurar estar libres de micobacterias.

RESUMENES DE ALGUNOS TRABAJOS SOBRE PARATUBERCULOSIS REALIZADOS POR NUESTRO GRUPO DE INVESTIGACION

1. Ajuste del punto de corte (cut-off) del ELISA para Paratuberculosis Bovina con sueros controles locales. Späth, E.; Paolicchi, F.; Morsella, C. 2002.

La exactitud de un test o prueba diagnóstica es la capacidad de dar un resultado verdadero sobre el estado de enfermedad de un individuo o una población en estudio. La exactitud se compone de dos características: la sensibilidad (Se) y la especificidad (Sp) diagnóstica. La sensibilidad es la probabilidad de dar un resultado positivo en una muestra de un animal infectado/enfermo, mientras que la especificidad es la probabilidad de dar un resultado negativo en una muestra de un animal no infectado/enfermo.

La habilidad de un test para discriminar un individuo o población sana de otra enferma depende de la determinación de un punto de corte (cut-off) realizado sobre la base del estudio en una población verdaderamente sana y otra verdaderamente enferma. Los resultados se pueden analizar por el análisis de la curva ROC (Receiver Operating Characteristic). Una curva ROC es un gráfico que traza el porcentaje de verdaderos positivos en función del porcentaje de falsos positivos con diferentes puntos de corte. Además calcula el valor del corte que tiene la mayor exactitud, es decir el que minimiza los resultados falsos negativos y falsos positivos. Además en la curva ROC se puede ver rápidamente para

cada punto de corte la Se y Sp. Si se incrementa el punto de corte decrece la proporción de falsos positivos pero la sensibilidad baja; si seleccionamos un punto de corte mas bajo se incrementa la sensibilidad pero se incrementan los falsos positivos.

El ELISA indirecto utilizado como rutina en INTA Balcarce utilizando antígeno PPA de M.paratuberculosis, recomienda calcular un índice (DO muestra / DO control negativo) cuyo valor se usa para clasificar al animal en tres grupos: negativo, sospechoso y positivo. Estos puntos de corte corresponden a estudios realizados en otro país, donde la población animal esta expuesta a otros organismos (especialmente Micobacterias) y donde la tuberculosis esta erradicada.

Actualmente se está realizando un trabajo para determinar un punto de corte obtenido localmente en función de muestras verdaderamente positivas y negativas del país. El «gold standard» para definir las muestras de animales verdaderamente positivos es el cultivo y aislamiento de Mycobacterium paratuberculosis de materia fecal u órganos en medio Herrold con mycobactina. Las muestras verdaderamente negativas consisten en sueros de bovinos adultos jóvenes de varios rodeos de la Provincia de Tierra del Fuego, Argentina. El rodeo bovino de esta provincia estuvo cerrado durante muchos años por las restricciones impuestas por la barrera de aftosa y nunca se observaron casos clínicos de PTBC. Para los fines prácticos de este trabajo, se considera que la PTBC en esa región es exótica.

Actualmente se cuenta con sueros de 90 bovinos de los que se cultivo M.paratuberculosis y sueros de 173 bovinos sanos de Tierra del Fuego. Para cada muestra que se sometió a ELISA se calculó el porcentaje de positividad (PP):

$$PP = \frac{DO \text{ promedio de la muestra}}{DO \text{ promedio del control positivo}} \times 100 =$$

El PP se utilizó para trazar la curva ROC. En los gráficos siguientes se observa la dispersión de los valores de PP para los sueros negativos y positivos (Figura 1) y el punto de corte optimizado por el programa (Figura 2). Si se cuenta con sueros de una muestra grande de un rodeo problema (o del rodeo completo) se pueden graficar todos lo DO's y utilizar el ELISA en forma semicuantitativa (Figura 3); es decir que además de contar con un punto de corte se puede priorizar la segregación de bovinos positivos con las DO's mas elevadas. Esto puede constituir una respuesta práctica a problemas de toma de decisiones del veterinario o productor.

Análisis de la curva ROC

Fig.1. Diagrama de puntos interactivo.

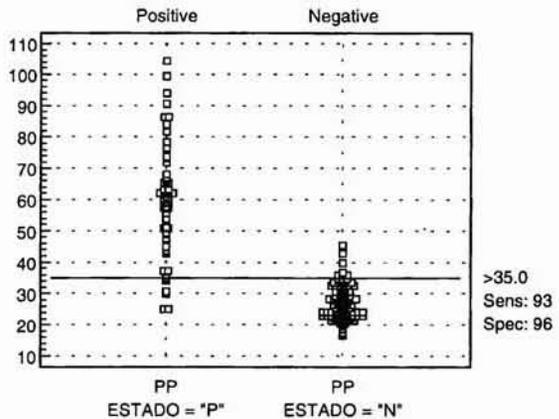


Fig. 2. Curva ROC/ELISA de PTBC

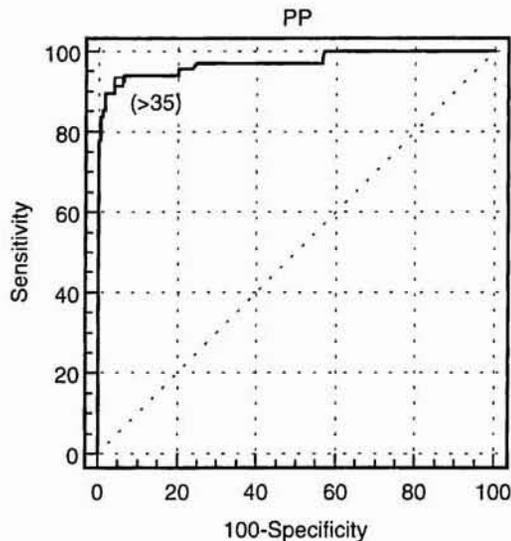


Figura 3. Ejemplo de distribución del PP en un tambo



2. «Diferentes métodos para el diagnóstico de *Mycobacterium avium subsp paratuberculosis* en bovinos de rodeo lechero en Argentina». Paolicchi et al. (Different methods for the diagnosis of *Mycobacterium avium subsp paratuberculosis* in a dairy cattle herd in Argentina). *Journal Veterinary Medicine, »B»,*50: 20-26, 2002.

La paratuberculosis (Ptbc) en Argentina tiene una alta prevalencia que afecta al ganado lechero y de carne. El diagnóstico de certeza de la enfermedad es el aislamiento del agente etiológico *Mycobacterium avium subsp paratuberculosis*, pero éste presenta dificultades y requiere un largo tiempo para su desarrollo en cultivo. El objetivo del trabajo fue evaluar diferentes técnicas para el diagnóstico de Ptbc bovina, en 25 vacas seleccionadas raza Holando Argentino adultas, sin sintomatología clínica evidente de la enfermedad, provenientes de un tambo en producción láctea. De cada animal se obtuvo: suero para serología por ELISA indirecto e inmunodifusión en agar (IDA), sangre entera para estimar la concentración de gamma interferón ((IFN) por estimulación con PPD bovina y PPD aviar. También se obtuvo materia fecal (MF) y leche (L) para realizar cultivo bacteriológico, la técnica de PCR y examen directo en frotis con tinción de Ziehl

Neelsen (ZN). Se realizó tuberculinización con PPD bovina en pliegue anocaudal. El 41,6% de los animales resultaron seropositivos a ELISA. Se aislaron 9 cepas de *M. paratuberculosis*, 7 de materia fecal, 2 de leche y una cepa de MF y de linfonódulos e intestino de un bovino necropsiado. Todos los animales excretadores de la bacteria en materia fecal fueron positivos a ELISA mientras que aquellos excretadores en leche fueron negativos y sólo el animal de necropsia resultó positivo a ELISA e IDA. En 4 animales se detectó una fuerte respuesta a la tuberculinización pero en ningún caso se aisló *Mycobacterium tuberculosis* y sólo uno de ellos con altos niveles de (IFN con PPD bovina. Sólo un animal con cultivo positivo en MF produjo altos niveles de (IFN aviar mientras que otro animal con cultivo positivo en L produjo altos niveles de (IFN con PPD aviar y bovina. Las PCR dirigidas a detectar IS900 (*M. paratuberculosis*) de MF y L fueron negativas, pero las PCR con material tomado del tubo de cultivo de MF y L dieron resultados positivos, antes de visualizar las colonias. Ninguna muestra fue positiva para la detección de IS6110 (complejo *M. tuberculosis*) por PCR. No siempre hubo concordancia entre aislamientos y ZN en las muestras estudiadas. El ELISA resultó útil para detectar animales positivos y excretadores por MF pero no en L. El PCR aplicado a los cultivos con desarrollo incipiente sin determinación visual de crecimiento de las colonias, fue eficaz para determinar específicamente la presencia de *M. paratuberculosis*. El test de (IFN tuvo baja sensibilidad debido a que se detectaron positivos a PPD bovina en casos de aislamiento de *M. paratuberculosis*. Se destaca la importancia de utilizar ELISA y cultivo, pero es necesario continuar con el desarrollo de (IFN para la detección precoz de la enfermedad.



Tabla 1: Resultados de la aplicación de diferentes métodos de diagnóstico en 25 animales adultos de un rodeo, interferón gamma (γ -INF), tuberculización con PPD bovina, ELISA, PCR y cultivo de leche o material fecal (MF) para identificar la infección con *Mycobacterium paratuberculosis* (vaca Nro 4202 necropsiada). Observe la característica de 2 vacas con aislamiento de la bacteria desde la leche pero con resultado en ELISA negativo. (Paolicchi et al, Journal Vet.Med. 50:20-26, 2002).

#Animal	γ INF	PPD bovina	ELISA	Leche			Materia fecal		
				PCR leche IS900	Cultivo	PCR cultivo IS900	PCR MF IS900	Cultivo	PCR cultivo IS900
324	+aviar	-	-	-	-	-	-	-	-
433	+aviar / +bovino	+	-	-	-	-	-	-	-
609	Neg	-	-	-	-	-	-	-	-
3581	Neg	-	-	-	-	-	-	-	-
3615	Neg	-	-	-	-	-	-	-	-
3763	+aviar	-	S	-	-	-	-	-	-
3805	Neg	-	-	-	-	-	-	-	-
3912	+aviar / +bovino	+	+	-	-	-	-	-	-
3922	+aviar / +bovino	+	-	-	+ HM	+	-	-	-
3999	Neg	-	+	-	-	-	-	+ HM	+
4011	+aviar / +bovino	-	-	-	-	-	-	-	-
4012	Neg	-	+	-	-	-	-	-	-
4030	Neg	-	+	-	-	-	-	-	-
4054	Neg	-	-	-	-	-	-	-	-
4064	Neg	-	-	-	+ HM	+	-	-	-
4105	Neg	-	+	-	-	-	-	-	-
4128	Neg	-	+	-	-	-	-	+ HM, +HMP	+
4138	Neg	-	+	-	-	-	-	-	-
4160	Neg	-	-	-	-	-	-	+ HM, +HMP	+
4171	Neg	-	+	-	-	-	-	+HMP	+
4174	Neg	-	S	-	-	-	-	-	-
4181	+aviar	-	+	-	-	-	-	+HMP	+
4224	Neg	-	+	-	-	-	-	+ HM, + HMP	+
4344	Neg	+	-	-	-	-	-	-	-
4202 * +	NR	NR	+	+	NR		+	+ HM, +HMP	

NR: No Realizado.
3. «Control de Paratuberculosis en una explotación de Ciervos Colorados en cautiverio de la Argentina». (Control of Paratuberculosis in an farm of Red Deer in captivity in Argentina.). Soler, P.; Verna, A.; Morsella, C.; Casaro, A.; Paolicchi, F. 7th International Colloquium on Paratuberculosis, 2002.

El ciervo colorado en cautiverio manifiesta clínicamente la Paratuberculosis a edad temprana, lo que

provoca un alto porcentaje de mortandad. Identificar los animales positivos posibilita eliminar del rodeo ciervos jóvenes lo que equivale a reducir la tasa de infección dentro del mismo. Nosotros aplicamos un modelo de control para mejorar la producción en un establecimiento dedicado a cabaña y cría de ciervos colorados en cautiverio en la Argentina. La enfermedad fue caracterizada mediante análisis serológico con el test de ELISA indirecto absorbido y el cultivo de materia fecal sobre medio Herrold con y sin micobactina, piruvato y antibióticos, junto

a la aplicación de medidas de manejo durante el período 1997-2003. Se realizó un sangrado anual sobre una población de 950 animales, machos y hembras con edades comprendidas entre los 15 hasta los 84 meses. Se analizaron un total de 6.717 sueros durante 7 años. La prevalencia de animales seropositivos hallada en el primer año del trabajo fue del 18,9% pero al siguiente año disminuyó significativamente hasta alcanzar 7,8%, lo que generó un gran impacto inicial en el control de la enfermedad. En los años sucesivos la seroprevalencia se mantuvo entre 7,5% y 8,5%. Esta aparente estabilización estuvo determinada por la falta de la rápida eliminación de la totalidad de los animales seropositivos, muchos de estos de 15 meses de edad, los que permanecieron en el establecimiento. A partir del año 2000 se ajustaron las medidas de control y se eliminaron el 100% de los animales positivos al ELISA y los enfermos, reduciendo la prevalencia hasta alcanzar actualmente el 3,8%. Asimismo durante el 2002 se redujo notablemente la mortalidad de animales y ya en el 2003 no se registraron muertes ni se detectaron lesiones compatibles con Paratuberculosis en los ciervos. La alta cantidad de animales jóvenes enfermos y positivos a ELISA es indicativa de la elevada tasa de contagio e infección que desarrolla el ciervo colorado en condiciones de cautiverio. Las prevalencias altas dificultan el control de la Paratuberculosis en poblaciones de ciervos en estas condiciones y por lo tanto se requiere implementar medidas rigurosas como las aplicadas en este seguimiento, la eliminación de seropositivos y clínicamente enfermos durante el saneamiento de esta enfermedad, lo que contribuye a disminuir la población de animales infectados y la tasa de contagio con *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*.

4. «Sobrevivencia de *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* en leche bovina sometida a pasteurización y destinada a la alimentación de terneros».

Paolicchi, F.; Verna, A.; Morsella, C.; Cipolla, A.; Seguro, R.; González, A.

In: XIV Reunión Científica de la Asociación Argentina de Laboratorios de Diagnóstico, Córdoba. 2002.

La leche bovina destinada a la alimentación de terneros criados en guachera puede contener patógenos que se transmiten vía oral diseminando enfermedades graves. La excreción de patógenos como *Mycobacterium bovis* y *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* desde la glándula mamaria de vacas infectadas es intermitente, pero resulta peligroso para la transmisión de Tuberculosis (TBC) y Paratuberculosis (PTBC) a los terneros alimentados con leche no destinada a consumo humano. Cortar la cadena de transmisión a través de la pasteurización (PT) de la leche sería deseable en los tambos en saneamiento. Objetivo: evaluar la eficacia de eliminación de la micobacteria patógena *M. paratuberculosis* y otra saprofita como *Mycobacterium phlei* de leche bovina inoculada experimentalmente y sometida a tratamiento por PT. Materiales y Métodos: Equipo: Pasteurizador de Leche para Terneros de fabricación nacional, instalado en la localidad de El Trébol, Provincia de Santa Fé. El régimen de PT fue de 300 litros de leche/hora, a 72,5 °C de temperatura y realizando modificaciones estructurales en el equipo para variar los tiempos de PT. Tratamientos: Se realizó la PT a: 1) 72,5

°C por 15", 2) 72,5 °C por 30" o, 3) 72,5 °C por 60". Entre cada tratamiento el equipo fue sometido a lavado con solución desinfectante y enjuagues para asegurar la limpieza del circuito. Muestras y estudio bacteriológico: 50 Lts de leche del primer ordeño proveniente de un tambo de la zona libre de Tuberculosis, fueron mantenidas a 4°C hasta su procesamiento. Se recolectaron en recipientes estériles 2 muestras de: A) leche cruda (200 ml) del tarro, y además desde la salida del equipo después de cada tratamiento como se describe a continuación: B) Leche cruda sometida a PT tradicional, C) Leche cruda inoculada con los siguientes cultivos: **M. paratuberculosis* (2,9x10⁶UFC/ml), cepa aislada de leche de bovinos con Paratuberculosis clínica, tipificada por dependencia a micobactina, PCR y RFLP (Patrón genotípico «A») y **M. phlei* (4x10⁴ UFC/ml), D) Leche cruda inoculada y sometida a PT a 72,5 °C por 15", E) Leche cruda inoculada y sometida a la PT a 72,5 °C por 30", F) Leche cruda inoculada y sometida a la PT a 72,5 °C por 60". Los recuentos bacterianos del inóculo se realizaron en duplicado por el método de Miles y Misra por microdilución cultivado sobre medio Herrold-Yema de huevo con micobactina (HYM) en placas de Petri. La leche cruda, o inoculada y sometida a PT y luego de cada tratamiento fue decontaminada con hexadecilpiridinium 0,75% y cultivada en HYM para evidenciar la presencia de las *Micobacterias inoculadas. Los cultivos fueron observados diariamente para identificación del desarrollo de *M. phlei* y cada 15 días hasta los 4 meses para *M. paratuberculosis* (1). Resultados: Las muestras de leche cruda del tambo resultaron negativas a las micobacterias estudiadas, mientras que de las muestras de leche inoculada no PT se recuperaron *M. paratuberculosis* y *M. phlei*. En las muestras de leche sometida a PT bajo cualquier tratamiento no fueron recuperadas micobacterias en HEYM. En la Tabla 1 se registran los resultados del estudio bacteriológico. Conclusiones: Los resultados preliminares del estudio bajo estas condiciones, marcan una adecuada eficiencia del Equipo Pasteurizador para eliminar micobacterias como las estudiadas aquí desde la leche cruda infectada experimentalmente. No se observaron diferencias utilizando cualquiera de los tres tiempos de pasteurización usados, por lo que realizando PT por 15" se reduce el tiempo del proceso respecto a los otros con igual efectividad. La leche cruda utilizada carecía de micobacterias como las estudiadas y contenía al inicio del estudio microorganismos comúnmente encontrados en leche de tambo, pero estos también fueron eliminados por PT. La mayor frecuencia de aislamientos bacterianos en leche provenientes de tambos en Argentina le corresponde a los géneros *Staphylococcus* spp, *Streptococcus* spp, *Escherichia coli*, entre otros, pero informes de frecuencia de aislamientos de *M. paratuberculosis* no fueron registrados en la bibliografía. Resulta importante el control de estos microorganismos en leche destinada a la alimentación en guacheras, pues de lo contrario pueden ser transmitidos a los terneros durante su etapa de crianza en estaca. Micobacterias tales como *M. paratuberculosis* que se excretan por leche intermitentemente, responsables de producir y mantener Paratuberculosis en bovinos, deberían ser eliminados antes que los terneros sean alimentados con la leche infectada. Si bien en este estudio preliminar no se probó la eliminación de otras micobacterias restaría comprobar la susceptibilidad de las mismas a la PT con temperaturas similares a las que fueron sometidas las muestras de leche. Si al menos tal susceptibilidad fuese similar a la



que demostró *M. paratuberculosis* en el estudio, podría asumirse que la PT de la leche bovina bajo estas condiciones destinada al consumo por terneros podría minimizar y contribuir a bajar los riesgos de transmisión de enfermedades crónicas por vía oral. Para evidenciarlo, otras pruebas deberían realizarse con un esquema similar al diseñado experimentalmente en este trabajo y con un mayor número de repeticiones.

TABLA 1: Recuento bacteriano de cada inoculo utilizado y detección o no de Micobacterias según el tipo de tratamiento (PT) dado a la leche. Referencias: Muestra A: Leche cruda; Muestra B: Leche cruda pasteurizada a 72,5°C x 15"; Muestra C: Leche cruda inoculada no pasteurizada; Muestra D: Leche inoculada pasteurizada a 72,5°C x 15"; Muestra E: Leche inoculada pasteurizada a 72,5°C x 30"; Muestra F: Leche inoculada pasteurizada a 72,5°C x 60". (Paolicchi y cols, 2002.)

Tipo de Muestra	Temperatura y Tiempo de pasteurización	Mycobacterium avium subsp paratuberculosis	Mycobacterium phlei
Muestra A	No PT	Negativo	Negativo
Muestra B	72,5°C x 15"	Negativo	Negativo
Muestra C	No PT	Positivo (2,9x10 ⁶ UFC/ml)	Positivo (4,0x10 ⁴ UFC/ml)
Muestra D	72,5°C x 15"	Negativo	Negativo
Muestra E	72,5°C x 30"	Negativo	Negativo
Muestra F	72,5°C x 60"	Negativo	Negativo

5. «Relación entre los microelementos Cobre, Zinc, Hierro, Selenio, Molibdeno y la Paratuberculosis en ganado bovino». Perea, J.; Morsella, C.; Cseh, S.; Paolicchi, F., In: XIV Reunión Científica de la Asociación Argentina de Laboratorios de Diagnóstico, Córdoba. 2002.

Introducción: *Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis* (Map) afecta a los rumiantes provocando paratuberculosis (PTBC). La deficiencia de cobre (Cu), selenio (Se) y zinc (Zn) y el exceso de hierro (Fe), molibdeno (Mo) y azufre (S), podría predisponer a su aparición en bovinos.

Objetivo: a) Identificar bovinos infectados con Map, por serología y aislamiento de Map en materia fecal, b) cuantificar el nivel de Cu, Zn, Fe y Se en sangre, de Cu, Zn, Fe y Mo en el forraje y de sulfatos (SO₄) y sales totales (ST) en agua, para relacionar la enfermedad con la concentración mineral.

Materiales y Métodos: Animales: 75 bovinos adultos, de dos rodeos (R1 y R2), muestras

- animales: a) materia fecal sembrada sobre medio de Herrold (micobactina, piruvato y antibióticos), para aislar Map. b) suero sometido a ELISA (PPA-3), para identificar seroreactores. c) cuantificación de Cu, Zn, Fe por espectrofotometría de absorción atómica y Se por actividad de glutatión peroxidasa (GSH- Px).
- forraje: concentración de Cu, Zn, Fe y Mo.
- agua de bebida: pH, concentración de SO₄ por turbidimetría y ST por gravimetría.

Resultados: ELISA: 13 resultaron positivos y 29 sospechosos.

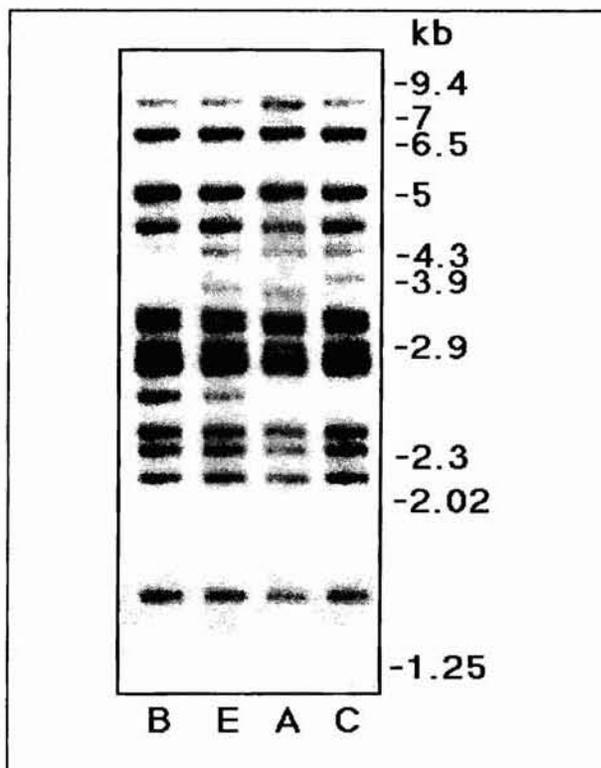
Aislamientos: 13 cepas de Map del cultivo de materia fecal, 6 cepas de animales positivos a ELISA, 6 de animales sospechosos a ELISA y una cepa de Map recuperada de un animal seronegativo. De los animales positivos a ELISA, 4/13 fueron deficientes en Cu y Se, 3 de ellos con aislamiento de Map. De los animales sospechosos al ELISA, 14 fueron deficientes de Cu (3 positivos a Map) y 3 deficientes en Se (1 positivo a Map). De 33 animales seronegativos 16 fueron deficientes en Cu y 4 de Se, pero los niveles de Fe, Zn y Hb fueron normales (Tabla 1). El contenido de Fe y Mo en la pastura fue elevado en R1 y R2. Los valores de Zn y Cu fueron normales en el forraje consumido por el R2, pero bajos en Cu del forraje del R1. En agua, ST y SO₄ fueron normales y con pH alcalino.

- Discusión:**
- Los bajos niveles de Cu (R1), altos valores de Mo (R1 y R2) y en ciertos períodos altos niveles de Fe en pastura, determinarían deficiencia primaria o secundaria de Cu en los animales.
 - En R1 los niveles de Cu en sangre fueron normales en el 80% de los animales. Esto sugiere movilización del Cu hepático almacenado, para mantener los niveles séricos normales, confirmando una correlación negativa entre niveles de Cu en sangre y en hígado.
 - En el R2, la deficiencia de Cu del 80% de los animales podría disminuir la habilidad de fagocitos para eliminar a Map.
 - Habría una tendencia entre presencia de enfermedad y baja actividad enzimática pues los valores más bajos de Se se registraron en animales positivos, con leve sintomatología de Ptbc, siendo normales sus niveles de Cu en sangre.
 - Los SO₄ y ST no provocarían interferencias con el metabolismo de Cu.
- Conclusión:

La deficiencia de Cu (primaria o secundaria) y la deficiencia de Se, podrían afectar negativamente al sistema inmunológico de los bovinos y consecuentemente la capacidad de respuesta a la infección con Map predisponiéndolos al desarrollo de Ptbc.

Tabla 1: Resultados de ELISA, cultivo bacteriológico y minerales en sangre. Los valores representan la media, el desvío estándar, el rango entre paréntesis y el n de cada grupo.

Total Nº animales	ELISA ₁	Cultivo Map		Cu (µg/ml)		Zn (µg/ml)	Fe (µg/ml)	GSH- Px (U/g Hb)		Hb (mg/ 100 ml)
		+	-	bajo / marginal	normal	normal	normal	bajo / marginal	normal	normal
R 1 n=45	(+)= 8	3	5	-	0,9 ± 0,31 (0,6-1,4) n=8	1,6 ± 0,27 (1,3-2,0) n=8	1,4 ± 0,17 (1,1-1,7) n=8	22,3 ± 8,50 (19-32) n=3	52,2 ± 14,35 (38-72) n=5	12,2 ± 0,75 (11,6-13,8) n=8
	(S)= 21	5	16	0,4 ± 0,12 (2,2-0,5) n=6	0,8 ± 0,15 (0,6-1,0) n=15	1,4 ± 0,39 (0,7-2,0) n=21	1,3 ± 0,24 (0,9-1,9) n=21	34 ± 0,71 (33-34) n=2	56 ± 12,13 (42-88) n=19	12 ± 1,24 (10-15,6) n=21
	(-)=16	1	15	0,5 ± 0,05 (0,4-0,5) n=4	0,9 ± 0,18 (0,6-1,3) n=12	1,3 ± 0,30 (0,7-2,1) n=16	1,3 ± 0,21 (1,0-1,7) n=16	32 ± 4,94 (28-35) n=2	55 ± 13,78 (38-78) n=14	12,4 ± 1,28 (10-14,4) n=16
R 2 n=30	(+)= 5	3	2	0,4 ± 0,11 (0,3-0,5) n=4	0,7 n=1	0,8 ± 0,13 (0,6-0,9) n=5	1,3 ± 0,14 (1,1-1,4) n=5	16 n=1	49 ± 7,74 (40-58) n=4	14 ± 1,00 (12,2-15,0) n=5
	(S)= 8	1	7	0,4 ± 0,08 n=8 (0,3-0,5)	-	1,0 ± 0,16 (0,8-1,4) n=8	1,3 ± 0,24 (0,9-1,5) n=8	33 n=1	61 ± 18,59 (40-94) n=7	14 ± 1,29 (11,3-15,6) n=8
	(-)=17	-	17	0,4 ± 0,11 (0,2-0,5) n=12	0,7 ± 0,08 (0,6-0,8) n=5	0,9 ± 0,12 (0,6-1,1) n=17	1,2 ± 0,14 (0,9-1,5) n=17	32 ± 1,41 (31-33) n=2	62 ± 22,65 (40-120) n=15	14 ± 1,98 (11,3-20,7) n=17


Mycobacterium paratuberculosis. Fuente IAP.

 Diferentes patrones (A, B, C, E) de cepas de *M. paratuberculosis* aisladas en Argentina y tipificadas en INTA. Vet.Microbiol., 1999.