

Estandarización de dos técnicas de aislamiento para detección de *Mycobacterium avium* subespecie paratuberculosis en bovinos

Standardizing two isolation techniques to detect *Mycobacterium avium*, subspecies paratuberculosis among bovines

Gabriel Jaime Medina ¹
Verónica Gómez ²
Ofelia Arroyave ³
Juan Guillermo Maldonado.⁴

Resumen

El microorganismo Mycobacterium avium subespecie paratuberculosis es el agente etiológico de una gastroenteritis severa en rumiantes, conocida como enfermedad de Johne, ha sido implicado en la etiología de la enfermedad de Crohn en humanos. La transmisión de la enfermedad puede ser tanto prenatal como posnatal, por lo tanto se requiere implementar un esquema de detección de las vacas no sintomáticas y sintomáticas que sean portadoras, y que eliminen el Mycobacterium avium subespecie paratuberculosis en materia fecal, por medio de una técnica de cultivo que inicialmente tiene que ser estandarizada para poder dar inicio a un programa eficiente de prevención y control de la enfermedad.

Este estudio pretende estandarizar dos técnicas de aislamiento en cultivo: la primera es un método adaptado a la técnica existente en el Instituto Nacional de Salud, y la segunda es el método adaptado al protocolo de Crossley. Para ambos métodos se procesaron 48 muestras, 20 de las cuales provenían de vacas que presentaban los signos y síntomas clínicos compatibles con la paratuberculosis bovina, y 28 vacas clínicamente sanas, todos los animales se encontraban en las mismas condiciones de alojamiento y tenían la

¹ Bacteriólogo Sc Microbiología ambiental, Colegio Mayor de Antioquia.

² Microbióloga y bioanalista de la Universidad de Antioquia.

³ Bacterióloga y laboratorista clínica de la Universidad de Antioquia.

⁴ Médico Veterinario y zootecnista, magíster en inmunología, doctor en ciencias básicas biomédicas PhD. Coordinador del grupo de investigación Centauros de la Universidad de Antioquia.

misma edad. Estas muestras fueron procesadas con las dos técnicas, para así lograr el correcto aislamiento del microorganismo, ya que junto con el seguimiento seriado mediante la toma de muestras de materia fecal y la identificación por PCR se convierten en técnicas precisas para determinar los animales portadores y excretores del *Mycobacterium avium* subespecie *paratuberculosis*.

Palabras clave: *Paratuberculosis* bovina, cultivo bacteriológico fecal, *Mycobacterium avium* subespecie *paratuberculosis*.

Abstract

The microorganism *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* is the etiological agent in severe gastroenteritis among ruminants, which is known as Johne's disease. It has been associated to the etiology of Crohn's disease among humans. This disease may be caught during both pre-and post- natal stages; therefore, it is required to implement a scheme for detecting symptomatic and asymptomatic cows, acting as carriers, and eliminating the *Mycobacterium avium*, subspecies *paratuberculosis* in stool using a culture technique. Also, this technique should initially be standardized in order to begin an effective program to prevent and control the disease. This study aims to standardize two culture isolation techniques. The first one is a method adapted to the existing technique at the National Institute of Health, and the second one is a method adapted to Crossley protocol. For both methods 48 samples were processed, 20 of which came from cows showing clinical signs and symptoms consistent with bovine *paratuberculosis*, and 28 came from clinically healthy cows—all animals had housing conditions and age in common. These samples were processed with both techniques, in order to achieve proper isolation of the organism, since along with serial follow by taking stool samples and PCR identification become accurate techniques for determining bearing animals and excretory *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis*.

Key words: *Paratuberculosis* bovine fecal bacterial culture, *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis*.

Introducción

Las bacterias del género *Mycobacterium* son organismos ácido alcohol resistentes (BAAR), que incluyen un número significativo de patógenos para animales y humanos. *Mycobacterium avium*, subespecie *paratuberculosis*, es el agente etiológico de una severa gastroenteritis en rumiantes conocida como enfermedad de Johne (Harris y Barletta, 2001; Whittington, Hope & Marshall, 2000; Sung & Collins, 2000). La *paratuberculosis* ha sido observada en ganado y rumiantes salvajes cautivos en todo el mundo (Hutchinson, 1996; Ferreira, Fonseca & Lilenbaun, 2002). Este agente persiste en los pastos sin multiplicarse durante largo tiempo y su potencial infectivo puede conservarse hasta un año, es relativamente sensible a la luz del sol y a la desecación, a un elevado

contenido de calcio y un pH alto en el suelo; el contacto continuo con orina y heces reduce su longevidad. Sin embargo, puede sobrevivir en estiércol líquido hasta 287 días, dependiendo de su composición y alcalinidad (Radostis, Gay, Blood & Hinchcliff, 2002; Whitlock & Buergelt, 1996; Jarnagin, Champion & Thoen, 1975).

La transmisión de la enfermedad puede ser prenatal o posnatal. La primera se ha reportado en fetos infectados por la vía transplacentaria, generalmente en vacas con signos clínicos y en vacas asintomáticas; la segunda se presenta por ingestión del microorganismo en alimentos o agua, siendo los animales jóvenes más susceptibles, especialmente durante las primeras 24 horas de

vida; a partir de un año de edad la susceptibilidad es igual que para los animales adultos (Sweeney, 1996).

La mayor fuente de contaminación con *Mycobacterium avium* subespecie *paratuberculosis* son las heces de animales infectados, principalmente en el área de partos, donde puede contaminar la ubre de las madres que luego servirá como fuente de infección para el ternero; también actúan como fuente de infección la leche y el calostro de vacas en estados avanzados de infección (Radostis et al., 2002).

Otros métodos de infección propuestos incluyen la transmisión por el semen de toros infectados, transferencia de embriones, a partir de rumiantes salvajes que actúan como reservorio, y por procedimientos veterinarios como el examen rectal (Sweeney, 1996).

El periodo de incubación de esta micobacteria varía de 2 a 3 o más años, y la enfermedad clínica es más observada en ganado de 3 a 6 años de edad. Algunos factores como el estrés, el parto o el incremento en la producción de leche pueden contribuir a la aparición de la enfermedad. Cuando los animales tienen signos clínicos evidentes, usualmente eliminan el microorganismo en las heces (Barreña, 1994). Sin embargo, algunos animales que eliminan microorganismos de forma intermitente pueden no ser detectados como positivos en una sola muestra fecal (Sweeney, 1996; Mutharia, Moreno & Raymond, 1997).

Cada animal con signos de enfermedad de Johne entra en una de cuatro categorías o estados de la enfermedad. Estos se establecen de acuerdo con la severidad de los signos clínicos, el potencial de eliminación de microorganismos en el ambiente y la probabilidad de detectar la enfermedad usando métodos corrientes de laboratorio. Por cada animal con enfermedad avanzada pueden existir 25 animales infectados en una granja (Whitlock y Buergelt, 1996).

La enfermedad de Johne ha sido diagnosticada en varios países de América y también en Colom-

bia, como es el caso de la Hacienda La Montaña, donde se ha diagnosticado la enfermedad por evidencias clínicas e histopatológicas y por prueba cutánea comparativa en el ganado adulto. Esto ha creado la necesidad de tomar medidas de control que eviten la diseminación del agente a otros hatos, entre ellas la de cerrar el hato, y con esta medida realizar el diagnóstico clínico para identificar aquellos animales negativos que serán utilizados para la venta como pie de cría o para otros hatos de la Facultad de Ciencias Agrarias de la Universidad de Antioquia. Para el control de la paratuberculosis bovina en un hato es importante la detección de los excretores fecales del microorganismo. Estos tienen más probabilidad de excretar el microorganismo en leche o calostro y transmitir la infección a los fetos por vía intrauterina; además, son los que mostrarán signos clínicos en un futuro cercano (Harris y Barletta, 2001).

Este estudio pretende implementar un esquema de detección de las vacas no sintomáticas y sintomáticas, que sean portadoras y eliminen el *Mycobacterium avium* subespecie *paratuberculosis* en materia fecal, por medio del aislamiento bacteriológico para poder dar inicio a un programa eficiente de prevención y control de la paratuberculosis bovina.

Materiales y métodos

Lugar: Las muestras fueron obtenidas en la Hacienda La Montaña, propiedad de la Universidad de Antioquia, localizada en la vereda El Hato del municipio de San Pedro de los Milagros en el departamento de Antioquia, dedicada a la producción pecuaria, extensión y docencia.

Toma y envío de muestras: Se tomaron 48 muestras de materia fecal de hembras mayores de 2 años de la raza Holstein, 20 vacas presentaban toda la sintomatología característica de la paratuberculosis bovina y 28 vacas no presentaban ningún signo ni síntoma de enfermedad. Las muestras se tomaron directamente del recto de cada animal con un guante estéril para examen rectal, previo lavado y desinfección del área perineal. Luego se colocaron en un recipiente de

plástico estéril y se refrigeraron a 4° C. Las muestras refrigeradas fueron enviadas al Laboratorio de Microbiología de la Facultad de Ciencias Agrarias de la Universidad de Antioquia, donde posteriormente se almacenaron y congelaron a -20° C para su procesamiento.

Procesamiento: Inicialmente, a todas las muestras se les realizó un frotis que posteriormente fue teñido con la coloración de Zielh-Neelsen para observar la presencia de bacilos ácido alcohol resistentes (BAAR), luego dos de las muestras fecales de cada uno de los animales se procesaron siguiendo el protocolo adaptado para aislamiento de *Mycobacterium* del Instituto Nacional de Salud (ver Anexo 1), y las otras dos muestras se procesaron por el método adaptado al protocolo de Crossley (ver Anexo 2), se sembraron en medio Ogawa Kudoh y se incubaron a 37° C en posición inclinada por una semana. Luego se colocarán en posición vertical, y se evaluarán semanalmente para detectar las colonias, hasta la semana 16.

En caso positivo, en tubos no contaminados se contará el número de unidades formadoras de colonias (UFC). Las colonias aisladas compatibles con *Mycobacterium avium* subespecie *paratuberculosis*, se conservarán adecuadamente para la posterior realización de la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) por parte del Laboratorio Departamental de la Seccional de Salud de Antioquia.

Resultados y discusión

En las muestras iniciales en la coloración de Zielh-Neelsen no se observaron estructuras compatibles con bacilos ácido-alcohol resistentes [BAAR], pero después de la incubación con caldo BHI durante 24 horas a 37° C se observaron estructuras compatibles con BAAR en 12 (60% de las vacas sintomáticas) de las muestras, que pertenecían a las vacas que presentaban sintomatología compatible con la paratuberculosis bovina, lo cual nos da un indicio de la presencia del microorganismo en las muestras.

A partir de la semana 8 de incubación se observó el crecimiento de colonias morfológicamente muy pequeñas (1-2 mm de diámetro), blanquecinas, rugosas y de bordes irregulares en los medios de cultivo de las 12 muestras con baciloscopia positiva para BAAR. A medida que los cultivos envejecían con la incubación, el tamaño de las colonias aumentaba formando una elevación central con desarrollo de un pigmento amarillo. Se realizó baciloscopia con coloración de Ziehl-Neelsen y se confirmó la presencia de bacilos ácido-alcohol resistentes compatibles con *Mycobacterium avium* subespecie *paratuberculosis*.

Una de las desventajas del aislamiento de *Mycobacterium avium* subespecie *paratuberculosis* por medio de cultivo bacteriológico fecal es la poca sensibilidad, generalmente por debajo de 50%, debido al bajo límite mínimo de detección de este método. De acuerdo con Merkal, el cultivo bacteriológico fecal solo detecta animales infectados que excretan > 100 UFC de *Mycobacterium avium* subespecie *paratuberculosis*, y los animales subclínicamente están por debajo de este nivel de excreción. Una de las maneras de aumentar la sensibilidad del cultivo bacteriológico fecal es concentrando, previo al cultivo, el agente en la muestra por medio de la centrifugación, la cual ha demostrado mejores resultados.

Otra de las dificultades de aislamiento de *Mycobacterium avium* subespecie *paratuberculosis*, a partir de muestras fecales, es el crecimiento más rápido y exuberante de agentes contaminantes, especialmente hongos y bacterias saprofitas, lo que incrementa los costos y el tiempo necesario para un diagnóstico oportuno de las vacas infectadas con el agente. Durante muchos años se utilizó Hidróxido de Sodio como descontaminante para el aislamiento de *Mycobacterium avium* subespecie *paratuberculosis* a partir de muestras fecales, sin embargo, aunque es altamente selectivo, está demostrado que este compuesto es tóxico para las micobacterias, y el tiempo de contacto debe restringirse al máximo para evitar efectos adversos en el crecimiento. Esto ha motivado a muchos investigadores a ensayar nuevos productos químicos como descontaminantes, con el fin de aumentar

la tasa de aislamiento a partir de tejidos y muestras fecales y disminuir los niveles de contaminación. Entre los nuevos productos el más utilizado es el trifosfato sódico con una concentración del 20% con o sin adición de antibióticos. En este estudio, para la descontaminación de las muestras fecales se utilizó en forma simultánea trifosfato sódico al 20%, y una solución antibiótica que contiene ácido nalidixico, Vancomicina y Amphotericina B, con excelentes resultados para la obtención de cultivos puros, ya que no solo fue posible aislar un elevado número de colonias de *Mycobacterium avium* subespecie *paratuberculosis*, sino que además la tasa de contaminación con hongos no tubo un porcentaje elevado de los cultivos al completar las 16 semanas de incubación, y solo se hizo evidente a partir de la semana 10 y que aumento gradualmente hasta el término del periodo de incubación.

ANEXO 1

Método adaptado de coprocultivo del Instituto Nacional de Salud

1. Agregar 2 g de materia fecal a un tubo con 5 ml de BHI (suspensión fecal).
2. Incubar de 18-24 horas a 37° C.
3. En un tubo de 50 ml añadir 5 ml de suspensión fecal y 10 ml de solución decontaminante (Trifosfato sódico al 20%).
4. Mezclar vigorosamente y agitar durante 30 minutos en agitador.
5. A esta solución agregar 35 ml de agua destilada estéril.
6. Centrifugar 30 minutos a 3.500 rpm.
7. Descartar el sobrenadante en Hipoclorito de sodio.
8. Resuspender el sedimento con 5 ml de agua destilada estéril y mezclar durante 30 segundos.
9. Sembrar de esta solución 200 ul en 2 tubos de Ogawa Kudoh.
10. Incubar durante una semana en posición horizontal con la tapa floja a 37° C.
11. Leer a la primera semana, ajustar las tapas de los tubos y cambiar a posición vertical.

12. Si hay crecimiento, hacer coloración de Zielh-Neelsen para hacer identificación. Si se observa contaminación, descarte; de lo contrario, continúe con la incubación.
13. Si no hubo crecimiento incubar 4 semanas, 8 y hasta la semana 12.
14. En caso de presentar crecimiento realizar coloración de Zielh Neelsen e identificación.

Nota: Si el cultivo no es puro, decontamine con HCl al 10% y siembre nuevamente.

15. Si al cabo de la semana 12 no se observa crecimiento, descarte e informe.

ANEXO 2

Método adaptado al protocolo de Crossley

16. Agregar 2 g de materia fecal a un tubo con 5 ml de BHI (suspensión fecal).
17. Incubar de 18-24 horas a 37° C.
18. En un tubo de 50 ml añadir 5 ml de suspensión fecal y 10 ml de solución decontaminante (Trifosfato sódico al 20%).
19. Mezclar vigorosamente y agitar durante 30 minutos en agitador.
20. Incubar la solución con decontaminante de 18-24 horas a 37° C.
21. Centrifugar 30 minutos a 3.500 rpm.
22. Descartar el sobrenadante en Hipoclorito de sodio.
23. Resuspender el sedimento con 5 ml de BHI con antibióticos [0,5 ml de Amphotericina B, 1 ml de ácido Nalidíxico y 1 ml de Vancomicina].
24. Incubar de 18-24 horas a 37° C.
25. Sembrar de esta solución 200 ul en 2 tubos de Ogawa Kudoh.
26. Incubar durante una semana en posición horizontal con la tapa floja a 37° C.
27. Leer a la primera semana, ajustar las tapas de los tubos y cambiar a posición vertical.
28. Si hay crecimiento hacer coloración de Zielh Neelsen para hacer identificación. Si se observa contaminación, descarte; de lo contrario, continúe con la incubación.
29. Si no hubo crecimiento, incubar 4 semanas, 8 y hasta la semana 12.

30. En caso de presentar crecimiento realizar coloración de Zielh Neelsen e identificación.
31. Nota: Si el cultivo no es puro, decontamine con HCl al 10% y siembre nuevamente.
32. Si al cabo de la semana 12 no se observa crecimiento, descarte e informe.

Referencias bibliográficas

Barreña H. (1994). Biología molecular y medicina. En J. Guizar (Ed.), *Genética clínica*. (2.ª ed., pp. 49-60). México: El Manual moderno.

Ferreira R., Fonseca L.S. y Lilenbaun W. (11-14 de junio, 2002). Agar gel inmunodifusion test (AGID) evaluation for detection on bovine paratuberculosis in Rio do Janeiro, Brazil. 7th International colloquium on paratuberculosis. Bilbao, España.

Harris N.B. y Barletta R. G. (2001). *Mycobacterium avium* subespecie *paratuberculosis* en Medicina veterinaria. *Clinical Microbiology*, 14, 489-512.

Hutchinson L. J. (1996). Impacto económico de la paratuberculosis. *Vet Clin North America*, 12, 373-381.

Jarnagin J.L., Champion M.L. y Thoen C.O. (1975, sept.). Seroagglutination Test for identification of *Mycobacterium avium paratuberculosis*. *Journal clinical of Microbiology*, 2(3), 268-269.

Mutharia L. M., Moreno W. y Raymond M. (1997). Analysis of culture filtrate and cell wall-associated antigens of *Mycobacterium paratuberculosis* with monoclonal antibodies. *Infection and immunity*, 387-394.

Radostis O., Gay C., Blood D. y Hinchcliff K. (2002). *Medicina Veterinaria*. Enfermedades causadas por bacterias IV. Enfermedades causadas por especies de *Mycobacterium*. (9.ª ed., pp. 1805-1808). Madrid: McGraw Hill.

Sung N, y Collins M.T. (2000). Effect of three factors in cheese production (pH, salt and heat) on *Mycobacterium avium* subespecie *paratuberculosis* viability. *Applied and environmental Microbiology*, April, 1334-1339.

Sweeney R. (1996). Transmisión de la paratuberculosis. *Vet. Clin North América*. 12, 305-312.

Whitlock R. y Buergelt C. (1996). Preclinical and clinical manifestations of paratuberculosis. *Vet. Clin North América*. 12, 345-356.

Whittington J., Hope A. y Marshall D. (2000). Molecular epidemiology of *Mycobacterium avium paratuberculosis*: IS9000 restriction fragment length polymorphism and IS1311 polymorphism analyses of isolates from animals and human in Australia. *Journal Microbiology*, 38, 3240-3248.