



## EFFECTIVIDAD DE LA LECHE COMO VÍA DE TRANSMISIÓN DE *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* A TERNEROS DE LECHERÍA

## EFFECTIVENESS OF MILK AS A TRANSMISSION ROUTE OF *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* IN DAIRY CALVES

Marcela Almeida-Rosero <sup>a</sup>, <https://orcid.org/0000-0002-2763-8245>

<sup>a</sup>Médica Veterinaria, Universidad de Nariño Universidad, Pasto, Colombia. [almeidamarcela218@gmail.com](mailto:almeidamarcela218@gmail.com)

Recibido: 21-09-2018 Aceptado: 01-08-2019

### RESUMEN

La paratuberculosis es una enfermedad infecciosa que afecta al ganado bovino, su largo periodo de incubación y rápida diseminación a nivel individual y de rebaño, dificultan su control, por estas razones ha sido difícil dimensionar la extensión de esta infección en rebaños lecheros en el sur de Chile. El objetivo del presente estudio fue conocer cuan efectiva es la transmisión vía leche de *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (MAP) a terneros en los primeros 90 días de vida. Se alimentaron 10 terneros provenientes de hatos libres de MAP con leche de vacas nodrizas infectadas confirmadas por cultivo y serología que fueron analizadas previamente en el laboratorio, los terneros fueron separados en dos grupos, el primero "A" recibió leche con una carga conocida de la bacteria ( $10^6$ /mL) y el grupo "B" (grupo control) recibió sustituto lácteo. A partir del primer mes de vida se analizaron muestras de materia y suero sanguíneo en los dos grupos de terneros, así como semanalmente se estudió la leche para confirmar la presencia de la bacteria en el grupo correspondiente. Como resultado, al tercer y cuarto mes post inicio del estudio uno de los individuos del grupo A fue detectado como positivo al cultivo de materia fecal de forma consecutiva, la presencia de MAP fue confirmada por PCR, uno de los terneros del mismo grupo fue positivo a ELISA en el mes cuarto y quinto del estudio. Se pudo concluir que, los terneros expuestos a una carga alta de MAP en leche, la transmisión de la infección vía leche fue 100% efectiva y el progreso de ésta fue más rápido de lo informado en la literatura. El presente estudio confirma que los terneros sometidos a una alta presión de infección podrían infectarse a temprana edad y convertirse en una fuente de infección de otros terneros.

**Palabras clave:** *Mycobacterium*, paratuberculosis, terneros

### ABSTRACT

Paratuberculosis is an infectious disease that affects mainly cattle; its long period of incubation and rapid dissemination at individual and herd level makes it difficult to control; for these reasons, it has been difficult to measure the extent of this infection in dairy herds of southern Chile. The aim of the present study was to know how effective is the transmission via the milk of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (MAP) to calves in the first 90 days of life. Ten calves from MAP free herds were fed with milk from infected nurse cows confirmed by fecal culture and serology that were previously analyzed in the laboratory; the calves were separated into two groups, the first "A" received milk

## Artículo de investigación

with a load known bacterium (106 / mL) and group "B" (control group) received milk replacer. From the first month of life, samples of fecal matter were analyzed, and blood serum in the two groups of calves and weekly the milk was studied to confirm the presence of the bacteria in the corresponding group. As a result, at the third and fourth month after the start of the study, one of the individuals in group A was detected as positive to the fecal culture in a consecutive manner, PCR confirmed the presence of MAP, one of the calves of the same group was positive to ELISA in the fourth and fifth month of the study. It was concluded that the calves exposed to a high load of MAP in milk, the transmission of the infection via milk were 100% effective, and the progress of this was faster than reported in the literature. The present study confirms that calves subjected to a high infection pressure could become infected at an early age and become a source of infection of other calves.

**Key words:** *Mycobacterium*, paratuberculosis, calves

## INTRODUCCIÓN

La *Mycobacterium avium* sub. *paratuberculosis* (MAP) es una bacteria Gram positiva, ácido alcohol resistente, aerobia, que se desarrolla intracelularmente; la temperatura óptima para su crecimiento es de 37°C. Morfológicamente es un bacilo pequeño, delgado, de desarrollo lento y se propaga con dificultad en los medios de cultivo; tiene una actividad metabólica baja y tiende a formar racimos de bacterias<sup>[1]</sup>. Presenta resistencia considerable a condiciones ambientales externas y agentes químicos, como álcalis y ácidos<sup>[2]</sup>; además, es capaz de soportar altas temperaturas, incluso en pasteurización de la leche comercial<sup>[3]</sup>. Puede afectar a un sinnúmero de mamíferos como los bovinos, ovinos, caprinos, camélidos e incluso primates, también se ha reportado la infección en animales de vida silvestre como zorros y conejo<sup>[2]</sup> es la responsable de la enfermedad de Jonhe en el ganado bovino, que se caracteriza por la presencia de lesiones intestinales granulomatosas de tipo crónico<sup>[4]</sup>.

La principal manifestación clínica es la diarrea acuosa, la notable pérdida de peso y la predisposición a la eliminación temprana de animales en edad productiva. En muchos casos los animales no presentan ningún signo clínico, pero, la bacteria se elimina por heces o leche<sup>[5]</sup>, siendo esta última la vía que representa mayor riesgo de transmisión para el ser humano, su carácter zoonótico ha sido vinculado con la enfermedad de Cronh que afecta al ser humano, hipótesis basada en el aislamiento del microorganismo en sangre de pacientes que padecen la enfermedad y la similitud histopatológica de las

lesiones con las manifestadas en el ganado, al igual que el aumento de los casos de Paratuberculosis en rumiantes y la enfermedad de Crohn en seres humanos.<sup>[6]</sup>

La principal vía de ingreso del patógeno al organismo es la oral. Los animales susceptibles ingieren calostro o leche contaminados o succionan pezones contaminados con MAP proveniente de madre o de otro animal infectado. Los bovinos también pueden infectarse por el consumo de forraje o agua contaminados, lo cual suele ser frecuente en explotaciones con una elevada proporción de animales infectados<sup>[1, 7]</sup>. Además, se ha demostrado la transmisión entre terneros, en experimentos en donde la eliminación del microorganismo es mayor cuando estos son infectados a temprana edad<sup>[8]</sup>; el principal factor de riesgo para el contagio de terneros recién nacidos era el contacto directo con heces de vacas infectadas, más que la ingestión de calostro de vacas positivas o leche contaminada; sin embargo, se ha demostrado la presencia de esta bacteria en la leche y su potencial riesgo para la transmisión de la madre a la cría.

El impacto económico de la Paratuberculosis se basa en la distribución mundial, la disminución de la producción láctea en rebaños afectados al igual que la reducción de la calidad sanitaria y la predisposición a otro tipo de enfermedades metabólicas, reproductivas o infecciosas y en algunos casos la muerte de los animales, además de costos asociados al manejo de la enfermedad y remplazo temprano de individuos afectados lleva a buscar con urgencia vías

de diagnóstico de la enfermedad, especialmente para animales jóvenes, de manera que sea posible reducir el riesgo de diseminación en hatos lecheros.

Teniendo en cuenta los anteriores argumentos, se planteó como objetivo de la presente investigación el estudio de la efectividad de la leche como fuente de infección hacia los terneros.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Población animal y diseño del estudio

Para el estudio se utilizó 10 terneros holstein machos, procedentes de cuatro predios con antecedentes de poseer baja tasa de infección, ubicados en la Región de los Ríos (Sur de Chile). Los terneros eran hijos de madres con al menos dos rondas de resultados negativos al cultivo de heces para la detección de MAP, y de rebaños sin antecedentes de paratuberculosis clínica. En su mayoría, los rebaños estaban compuestos de animales de las razas holstein y frisón negro. El manejo del ganado en la mayoría de los rebaños se definió como extensivo, caracterizado por pastoreo directo durante todo el año.

Luego de ingerir calostro de sus madres, fueron transportados al campo experimental donde se estableció el experimento. Paralelamente, se adquirieron cinco vacas en lactancia que se encontraban infectadas e infecciosas, a partir de un rebaño infectado. Un "pool" de leche de estas vacas se utilizó para alimentar a los terneros en estudio.

Los terneros fueron alimentados con cuatro litros de leche y/o sustituto lácteo al día y fueron separados en dos grupos de cinco animales por cada uno: el Grupo A recibió leche naturalmente contaminada con MAP estimada en una concentración de  $10^6$ /ml; el Grupo B, recibió sustituto lácteo. Los terneros fueron mantenidos en corrales colectivos de acuerdo con cada grupo según el tratamiento. Los primeros tres meses recibieron dieta láctea, según tratamiento, mas 1 kg de concentrado de crecimiento y agua ad libitum.

El curso de la infección fue evaluado in vivo mensualmente utilizando dos parámetros: eliminación de MAP por heces y presencia de anticuerpos séricos contra MAP. Muestras individuales de sangre y heces fueron recolectadas

para examinar la respuesta inmune y la eliminación de MAP en heces antes de la primera toma de leche y en intervalos regulares luego de la administración de la leche y/o sustituto lácteo.

### Toma y procesamiento de la muestra

Las muestras de heces fueron obtenidas directamente desde el recto de los animales, utilizando para ello mangas individuales de palpación, extrayendo 5 a 10 gramos de heces por individuo.

Se recolectó muestras de leche de manera individual de cada cuarto mamario para la obtención de una muestra compuesta depositada en un estanque para su tratamiento, se tomó una muestra de aproximadamente 50 ml en tubos falcon estériles.

Finalmente se tomaron alrededor de 3 a 5 ml de sangre obtenida por venopunción de la vena yugular y coccígea, utilizando para ello tubos Vacutainer con coagulante y agujas individuales para cada animal.

Todas las muestras fueron mantenidas a temperatura ambiente hasta su traslado al Laboratorio de enfermedades infecciosas, Instituto de Medicina Preventiva Veterinaria, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Austral de Chile, Valdivia. En el laboratorio, sólo las muestras de sangre fueron mantenidas a temperatura ambiente para la posterior obtención de suero, mientras que las muestras de heces y leche se mantuvieron refrigeradas a una temperatura de 4°C hasta su procesamiento al día siguiente del arribo al laboratorio. Las muestras de leche fueron llevadas una vez por semana desde el mes de octubre del 2017 hasta febrero de 2018, las muestras de materia fecal y sangre se tomaron una vez por mes desde noviembre hasta abril de 2018.

## Artículo de investigación

### **Protocolo para cultivo bacteriológico de MAP a partir de materia fecal**

Las muestras de materia fecal se procesarán de acuerdo a los protocolos para el cultivo de heces bovino en el sistema de cultivo líquido automatizado BACTEC-MGIT 960, según las indicaciones del fabricante (Becton Dickinson, Sparks, MD).

### **Protocolo para cultivo bacteriológico de MAP a partir de leche**

El cultivo de muestras de material fecal y leche se realizó usando el sistema de cultivo automatizado BACTEC MGIT 960. Las muestras fueron sometidas a un proceso de descontaminación fúngica y bacteriana previo a la inoculación de la muestra tratada en el medio de cultivo. Todo el proceso de cultivo se realizó de acuerdo con las indicaciones del fabricante (Becton Dickinson, Sparks, MD).

### **Detección de anticuerpos séricos ELISA (ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas)**

Para la detección de anticuerpos anti-MAP se utilizó la prueba serológica de ELISA (Pourquier® ELISA PARATUBERCULOSIS, Insitute Pourquier-France), siguiendo el protocolo recomendado por el fabricante. La medición y registro de la absorbancia o densidad óptica

(DO) se realizó con un lector de ELISA (Biotek Instrument, Inc. VT. USA) utilizando un filtro de 450 nm. La presencia o ausencia de anticuerpos anti MAP se determinó, de acuerdo a recomendación del fabricante, calculando la razón DO muestra/DO control (S/P) para cada muestra. Para que el ensayo sea válido, la razón entre la media del control positivo y la media del control negativo (P/N) debió ser mayor o igual a 3; además, la media del control positivo debió ser mayor o igual a 0,35.

### **Confirmación molecular de cultivos**

Las muestras de materia fecal y leche que mostraron señales positivas, en el equipo BACTEC-MGIT 960, antes de los 49 días fueron sometidas a confirmación molecular utilizando para ello el kit de extracción y purificación de ADN (Roche), siguiendo de manera estricta las instrucciones del fabricante. Se utilizó un sistema de PCR en tiempo real para confirmar las muestras que indicaron ser sospechosas de la presencia de MAP.

### **Análisis estadístico**

En el experimento se evaluó las diferencias significativas existentes en la tasa de eliminación de MAP y anticuerpos anti-MAP entre terneros de los grupos A y B, usando la prueba exacta de Fisher.

## **RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

Ningún ternero del grupo B o control (alimentado con sustituto lácteo) mostró títulos de anticuerpos ni eliminación de fecal de MAP durante los cinco meses del estudio. Los terneros pertenecientes al grupo que recibió leche contaminada con MAP en una tasa de  $10^6$ /ml, presentaron diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) en relación con la tasa de resultados positivos a ELISA y la tasa de eliminación fecal de MAP (Tablas 1 y 2).

Las principales vías de transmisión de la infección por MAP son: fecal-oral, mamaria y congénita; los individuos más susceptibles de

infectarse son los terneros con edad menor de seis meses de edad, especialmente los recién nacidos <sup>[12]</sup>, principalmente por presentar una mayor permeabilidad intestinal, además de la falta de madurez del sistema inmune. Por otro lado, MAP es capaz de evadir al sistema inmune de su hospedero, ya que se ha demostrado ser capaz de sobrevivir dentro de los macrófagos, lo que explica el largo período subclínico (2-10 años) con que cursa esta infección, lo cual dificulta la detección temprana de la bacteria en mención <sup>[12]</sup>, especialmente en los animales más jóvenes.

**Tabla 1. Resultados de la detección de anticuerpos por el método ELISA en terneros alimentados con leche contaminada con una carga de  $10^6$ /ml de MAP**

F.N.	Nov	Dic	Ene	Feb	Mar	Abr
70817	-	-	-	-	-	-
50917	-	-	-	-	-	-
300917	-	-	-	-	+	+
11017	-	-	-	-	-	-
21017	-	-	-	-	-	-

**Tabla 2. Resultados de cultivo bacteriológico de materia fecal del grupo de terneros alimentados con leche contaminada con una carga de  $10^6$ /ml de MAP**

F.N.	Nov	Dic	Ene	Feb	Mar	Abr
70817	neg	neg	neg	neg	neg	neg
50917	neg	neg	neg	neg	neg	neg
300917	neg	neg	neg	neg	neg	neg
11017	neg	neg	neg	neg	neg	neg
21017	neg	neg	pos	pos	neg	neg

Debido al periodo de incubación prolongado que presenta la enfermedad, los signos clínicos solo son evidenciados en edades adultas del bovino, por lo que en el estudio no se observaron cambios asociados a la enfermedad, los 10 terneros fueron revisados de manera periódica, mediante examen físico general, medición de constantes fisiológicas y peso, sin presentar signo alguno que indicase el curso de un estado patológico.

De lo anterior, nace la necesidad de mejorar la capacidad diagnóstica de los métodos de detección tradicionales.

Muchos rebaños mantienen a los terneros recién nacidos con sus madres para que consuman calostro, lo cual favorece la exposición de los terneros a materia fecal de animales adultos y la transmisión de la infección. Por otro lado, la práctica de alimentar a los terneros con calostro o leche proveniente de múltiples vacas incrementa el riesgo de transmisión de MAP debido a la posibilidad de que al menos una vaca esté

eliminando MAP, aumentando el número de terneros expuestos a la bacteria <sup>[13]</sup>. Incluso si la carga bacteriana eliminada por calostro es alta, los terneros podrían llegar a ser una fuente de transmisión para los otros terneros. Por lo tanto, si los terneros recién nacidos son los individuos más susceptibles a una nueva infección dentro de un rebaño lechero y el diagnóstico de la infección en individuos jóvenes es complejo, las estrategias de control deberían entonces estar enfocadas en disminuir o evitar el contacto de estos terneros con heces de animales infectados o calostro-leche contaminados con MAP, además de suministrar el calostro a partir de una sola fuente <sup>[14]</sup>.

Otra alternativa, podría consistir en disminuir la carga de MAP en calostro-leche usando algún protocolo descontaminante. Sin embargo, los protocolos actualmente disponibles no son económicamente rentables para la mayoría de los predios lecheros, por lo que rara vez son usados.

## CONCLUSIÓN

A modo de conclusión, los terneros expuestos y desafiados con cargas altas de MAP, pueden eliminar el patógeno al ambiente tan temprano

como a los tres meses de edad, lo que representaría una fuente de infección adicional para los otros terneros. Los programas de control de la

## Artículo de investigación

infección deberían considerar esta situación y en animales jóvenes en rebaños bovinos lecher- se debería aconsejar hacer vigilancia también ros.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] Chiodini R, Van Kruiningen H, Merkal R S. Ruminant paratuberculosis. Cornell The Current status and future prospects; 1984.
- [2] Manning E y Collins M. *Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis*: pathogen, pathogenesis and diagnosis. Wisconsin Scholl of Veterinary Medicine; 2001.
- [3] Grant I. Does mycobacterium avium subsp. paratuberculosis survive current pasteurization conditions? s.l. Appl environ Microbiol; 1998.
- [4] Meza I y otros. Desarrollo de una prueba de ELISA para el diagnóstico de infección por *Brucella canis* en perros. s.l. Avances en ciencias veterinarias; 2012.
- [5] Benavides E y Polanco N. Epidemiología de hemoparasitos y endoparasitos en bovinos de zonas de reconversion ganadera la Macarena. Revista Médica Veterinaria; 2017.
- [6] Eisenberg S y Col. Intestinal infection following aerosol challenge of calves with *Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis*. s.l: Veterinary Research; 2011.
- [7] Diéguez F y otros. Monitoring bovina viral diarrhoea virus (BVDV) infection status in dairy herds. Lugo, España: Unidad de Epidemiología y Sanidad Animal, Instituto de Investigación; 2008.
- [8] Benedictus G y otros. Management Practices associated whit the incidence rate of clinical mastitis during early lactation on reproductiva performance of Jersey cows. s.l. Dairy Sicience; 1999.
- [9] Grant I R, Ball H J, Rowe M T. Isolation of *Mycobacterium Paratuberculosis* from milk by immunomagnetic separation. s.l: Appl Environ Microbiol; 1998, 64.
- [10] Morón F J y otros. Prevalencia de la infección por *Mycobacterium avium subespecie paratuberculosis* en rebaños de ovinos de dos municipios de San Luis Potosí. Revista Científica. 2013; XXIII (4): 293-299. <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=95926991008> > ISSN 0798-2259.
- [11] Retamal P, Beltrán C, Abalos P, Quera R, Hermoso M. *Mycobacterium avium* subsp paratuberculosis y enfermedad de Crohn: evidencias de una zoonosis. Rev. méd. Chile. 2011; 139 (6): 794-801. [http://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0034-98872011000600015&lng=es](http://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0034-98872011000600015&lng=es).
- [12] Sweeney R W. 2011. Pathogenesis of Paratuberculosis. Vet Clin Food Anim. 27; 537–546.
- [13] Bakker D. Paratuberculosis control measures in Europe. In: Behr M, Collins D M. (Eds.). Paratuberculosis: Organism, Disease, Control. CABI, UK; 2010. pp 330-343.
- [14] Lombard J E. Epidemiology and economics of paratuberculosis. Vet Clin Food Anim. 2011; 27: 525-535.
- [15] Garry F. Control of paratuberculosis in dairy herds. Vet Clin Food Anim. 2011; 27: 599-607.