

Enfermedades sistémicas o multiorgánicas (2da parte)

Curso de Enfermedades de los rumiantes y cerdos.

Dr. Gabriel Eduardo, Travería

Dra. María Fiorella, Alvarado Pinedo.

Introducción.

Se entiende por enfermedades sistémicas o multiorgánicas a aquellas que involucran a varios órganos, sistemas o todo el organismo. Estas enfermedades pueden ser de etiología variada. La presencia de signos clínicos asociados a inflamación o la pérdida de función de un órgano nos debe hacer pensar en la existencia de una enfermedad de etiología infecciosa. Los microorganismos al multiplicarse en el huésped o la producción de toxinas por parte de algunos patógenos son los responsables de estos cuadros mórbidos. Estas infecciones tienen como resultado final: 1) la **erradicación** del agente infectante (resolución), 2) la infección crónica, 3) la **eliminación prolongada** del microorganismo (estado de portador), o 4) la **persistencia** o **latencia** del agente causal en los tejidos del huésped.

La capacidad de un microorganismo para originar enfermedad depende del balance o interacción entre su poder patógeno intrínseco (virulencia) y los mecanismos de respuesta inmune del huésped que intentan contrarrestar y neutralizar la infección.

Los factores de virulencia son propiedades del microorganismo que les permite colonizar, proliferar, invadir y destruir los tejidos del huésped. Muchos microorganismos de virulencia habitualmente baja pueden dar lugar a una enfermedad grave en animales inmunodeprimidos y son llamados **gérmenes oportunistas**. En algunos casos, la lesión tisular se debe al gran número de parásitos o a reacciones exacerbadas del huésped.

En los rumiantes podemos describir **áreas que son generalmente portadoras de microorganismos** (boca, nasofaringe, bucofaringe, rumen, red, omaso, íleon caudal, intestino grueso, órganos genitales externos, uretra craneal, vagina, piel, conducto auditivo externo, conjuntiva ocular) y aquellas que son **generalmente estériles** o que sólo en ocasiones albergan pocos microbios pero son **susceptibles de quedar colonizadas** (laringe, tráquea y resto de vías conductoras de aire, senos paranasales, esófago, abomaso, riñones, uréteres, vejiga, globo ocular, sangre y líquido cefalorraquídeo).

Las enfermedades multiorgánicas en los rumiantes son producidas generalmente por gérmenes bacterianos y virus, siendo raras las afecciones fúngicas de este tipo.

Enfermedades sistémicas o multiorgánicas (2da parte)

Curso de Enfermedades de los rumiantes y cerdos.

Dr. Gabriel Eduardo, Travería
Dra. María Fiorella, Alvarado Pinedo.

A continuación describiremos tres modelos de enfermedades sistémicas que pueden afectar a los rumiantes: la paratuberculosis, tuberculosis, diarrea viral bovina y carbunco bacteridiano.

Paratuberculosis

Introducción

La paratuberculosis también llamada “enfermedad de Johne” fue descubierta por Johne y Frothingham en 1895, es una enfermedad crónica y debilitante de los rumiantes caracterizada por una ileocolitis granulomatosa crónica con linfangitis y linfadenitis regional con pérdida progresiva de peso. En los bovinos se caracteriza por baja producción láctea, mala condición corporal y diarrea intermitente. No se puede tratar con antibióticos y una vez que se presenta la diarrea en forma continua los animales mueren emaciados en lapsos de semanas. La ausencia de signos generales de enfermedad la distinguen de otros desórdenes intestinales, los animales infectados conservan el buen apetito se encuentran alertas y no presentan fiebre. El agente causal es el *Mycobacterium avium* subsp *paratuberculosis*, un bacilo ácido alcohol resistente que es débilmente Gram positivo. Es de forma bacilar, tiene un tamaño de 0,5 a 1,5 μm , en las muestras clínicas aparece en forma agrupada (ovillos). Para su cultivo es de crecimiento sumamente lento. Crece en medios de cultivo con huevo como Löwenstein-Jensen, Herrold y medios sintéticos, la bacteria requiere de un factor de crecimiento llamado micobactina, un sideróforo quelante del hierro. El tiempo necesario para la formación de colonias visibles es de 6-8 semanas, algunas cepas requieren de 6 meses. Bioquímicamente es relativamente inactiva y la identificación se basa en el crecimiento lento, presentación en acúmulos positivos a la coloración de Ziehl Neelsen, la dependencia por la micobactina y la detección de la secuencia de inserción IS900 mediante PCR (reacción en cadena de la polimerasa). Esta micobacteria es relativamente homogénea pero se observan algunas diferencias. Las cepas ovinas difieren bastante en las propiedades culturales tanto como para determinar un tipo ovino. Puede sobrevivir más de un año en heces, agua de canales, pasturas y silos. Los rodeos se infectan al ingresar animales enfermos y usualmente pasan años hasta que los dueños se enteran de la presencia de la enfermedad. Los vacunos se infectan de terneros por contacto con heces infecciosas en el parto, ingiriendo calostro, leche de un animal

Enfermedades sistémicas o multiorgánicas (2da parte)

Curso de Enfermedades de los rumiantes y cerdos.

Dr. Gabriel Eduardo, Travería
Dra. María Fiorella, Alvarado Pinedo.

infectado o por ingestión de alimentos contaminados con materia fecal proveniente de animales enfermos. El período entre la infección y la aparición de los primeros síntomas está entre 2 a 12 años dependiendo del grado de resistencia individual, dosis infectiva y de la edad al tiempo de exposición. El diagnóstico presenta muchas dificultades por su período de incubación largo. El cultivo de materia fecal se considera como la prueba diagnóstica de oro, es la más sensible y sólo detectará el 50% de los animales que están enfermos. La prueba de ELISA detecta solo un tercio de los animales que son detectados por el cultivo de materia fecal. Aquellos animales que no están eliminando el suficiente número de bacterias como para ser detectados por cultivo o que no han desarrollado una respuesta humoral no pueden ser detectados por estos métodos. La única forma de detectar estos animales en las primeras etapas de la enfermedad es mediante la detección de la inmunidad celular con la prueba de tuberculínica o interferón gamma.

La paratuberculosis tiene su correlato en los humanos con la enfermedad de Crohn, una enfermedad muy similar en donde las evidencias sobre su etiología señalan al *Mycobacterium avium* subsp *paratuberculosis* como el agente causal. Esta situación se agrava por la mayor resistencia del *Mycobacterium avium* subsp *paratuberculosis* a la pasteurización, y por la eliminación de la bacteria en la leche de los animales que se encuentran en un avanzado estado de infección.

En Argentina, la paratuberculosis ocupa los primeros lugares como causa de muerte infecciosa en los bovinos adultos, el manejo de la enfermedad se encuentra limitado por la complejidad del diagnóstico, la imposibilidad del tratamiento y las dificultades que presenta la vacunación. Las estrategias eficientes de control tienen como pilares la detección y eliminación de los animales enfermos y sus fuentes de contagio.

Epizootiología

La mayor susceptibilidad a la infección se da en los animales menores de 30 días, pero los casos clínicos en los bovinos no se desarrollan antes de los 2-12 años de vida. Cuando las prevalencias son muy altas se puede presentar algunos signos clínicos en animales menores de 2 años, incluso animales de 1 año de vida. Los estudios de experimentación demuestran que la infección se favorece en animales jóvenes con altas dosis de bacterias. Otros factores de riesgo son los sistemas de explotación intensivos, los suelos ácidos, las dietas pobres, el estrés relacionado al transporte, la lactancia, el

Enfermedades sistémicas o multiorgánicas (2da parte)

Curso de Enfermedades de los rumiantes y cerdos.

Dr. Gabriel Eduardo, Travería
Dra. María Fiorella, Alvarado Pinedo.

parto y la inmunosupresión por agentes como la diarrea viral bovina. Un factor importante es el contacto estrecho de los animales susceptibles con materia fecal contaminada, este factor podría ser el responsable de la mayor prevalencia observada en los animales de explotación lechera con respecto a los animales de explotación para consumo de carne. También se ha comprobado la transmisión a través del útero y eliminación bacteriana por leche y calostro.

Estructura Antigénica

Los antígenos que presentan mayor importancia antigénica son los siguientes:

Glicolípidos: La superficie externa de las micobacterias consiste predominantemente de lípidos y carbohidratos los cuales podrían estar vinculados con la sobrevivencia de la micobacteria en el interior de los macrófagos. Una característica única de las micobacterias es la estructura y composición de la envoltura celular: compuesta por lípidos tales como fosfolípidos, glicolípidos, peptidolípidos y micósidos. Una molécula prominente de mucha importancia es el lipoarabinomano (LAM), pertenece a la pared celular, y es un lipopolisacárido reconocido como una forma multiglicosilada manosil fosfatidil inositol. Se asume que esta molécula tiene un anclaje con la membrana celular y se extiende hacia fuera a través de la capa de peptidoglicano de forma similar al ácido teicoico en las bacterias Gram positivas. Las propiedades del LAM son comparables a los lipopolisacáridos de las bacterias Gram negativas. El LAM ha sido usado en forma exitosa como antígeno diagnóstico en ELISA, indicando su fuerte inmunoreactividad.

Proteínas: El complejo antigénico mayor en *Mycobacterium avium* subsp *paratuberculosis* se llama A36. Contiene aproximadamente 30 proteínas con peso molecular que varían desde 20 a 90 kDa, los componentes más antigénicos de la inmunidad celular y humoral se encuentran en el rango de 28-45 kDa. La proteína de 34 kDa constituida por tres polipéptidos contiene el péptido A36 el cual parece ser específica de especie para esta bacteria. Está demostrado que los animales infectados desarrollan anticuerpos contra ese péptido.

La secuencia de inserción IS900 es única de *Mycobacterium avium* subsp *paratuberculosis* y expresa la proteína p43.

Las proteínas de estrés se presentan cuando una micobacteria ingresa en una célula fagocítica, es probable que sea sujeta a privación de nutrientes y a limitaciones en

Enfermedades sistémicas o multiorgánicas (2da parte)

Curso de Enfermedades de los rumiantes y cerdos.

Dr. Gabriel Eduardo, Travería
Dra. María Fiorella, Alvarado Pinedo.

cuanto al hierro además de ser expuesta a enzimas degradativas y metabolitos tóxicos del oxígeno.

Infección

La mayor fuente de infección es la materia fecal proveniente de los animales infectados. El período de incubación largo permite la eliminación por materia fecal aproximadamente unos 18 meses antes de la aparición de cualquier signo clínico. Pero la eliminación es particularmente elevada en los animales con enfermedad clínica 10^{6-8} UFC por gramo de materia fecal (5×10^{12} micobacterias por día) si tomamos en cuenta que la dosis infectante para un ternero es de 10^3 UFC un animal con signos clínicos es la principal fuente de contagio. La contaminación de las ubres con materia fecal y la presencia de la micobacteria en la leche y en el calostro ocasionan que los animales que se encuentran mamando ingieran grandes dosis del microorganismo; también pueden ser responsables el agua y las pasturas contaminadas. La micobacteria también se ha recuperado del útero y de placentas de vacas infectadas y la contaminación intrauterina del feto también puede ocurrir pero con menor frecuencia. La ingestión de la micobacteria es la principal vía de infección.

Función del hierro en la infección por *Mycobacterium avium* subsp *paratuberculosis*

Los hospedadores mamíferos restringen en forma activa el hierro a los patógenos bacterianos. Las citoquinas podrían funcionar limitando la concentración intracelular del hierro en los macrófagos intentando de esta forma restringir el crecimiento bacteriano. Los macrófagos activados dejan de expresar los receptores para transferrina. El hierro que se encuentra formando complejos con moléculas del hospedador como ser ferritina, lactoferrina, transferrina e incluso hemosiderina puede ser utilizado por la micobacteria intracelular. En la mayoría de las bacterias patógenas, incluidas las micobacterias, la virulencia se asocia con la capacidad de estos gérmenes para adquirir hierro en condiciones limitantes. Una de las formas propuestas de controlar la multiplicación de micobacterias, es removiendo el hierro o cationes bivalentes de los espacios lisosomales a través de la proteína macrofágica asociada a la resistencia natural (Nramp1), la cual se expresa exclusivamente en los compartimentos lisosomales de los monocitos y de los macrófagos, disminuyendo de esta forma el hierro disponible para las bacterias

Enfermedades sistémicas o multiorgánicas (2da parte)

Curso de Enfermedades de los rumiantes y cerdos.

Dr. Gabriel Eduardo, Travería
Dra. María Fiorella, Alvarado Pinedo.

intracelulares. Para tomar el hierro limitante la mayoría de las micobacterias producen micobactina: un sideróforo liposoluble, y un sideróforo hidrosoluble: la exoquelina. Sin embargo la micobactina no es sintetizada en el hospedador por lo tanto otra clase de proteína quelante del hierro exoquelina ha ganado interés recientemente. No está del todo claro como puede sobrevivir en forma intracelular *Mycobacterium avium* subsp *paratuberculosis* bacteria auxotrofa (bacteria que para su desarrollo en un medio requiere de una sustancia específica) de micobactina (produce solo exoquelina) siendo que se necesitan los dos sideróforos para la patogenicidad de las micobacterias.

La ferritina, la mayor forma de depósito intracelular de hierro, se ha encontrado acumulada coincidentemente con *Mycobacterium avium* subsp *paratuberculosis* intracelular y las lesiones de los animales infectados. También se ha encontrado una producción significativa de reductasa en el íleon de animales enfermos.

Signos clínicos

Los signos clínicos característicos de la paratuberculosis incluyen pérdida progresiva de peso con diarrea, la cual puede ser intermitente o también presentarse en forma crónica. La enfermedad clínica se puede precipitar por factores estresantes como el parto, o la lactancia. También se puede observar baja en la producción láctea. Los animales mantienen buen apetito y no se observan signos de toxemia o pirexia. La pérdida de peso es consecuencia de la malabsorción y pérdida de proteínas causado por el llamativo infiltrado celular y el edema de la mucosa intestinal. La síntesis de proteína por parte del hígado trata de compensar la pérdida, pero cuando estos mecanismos son sobrepasados sobreviene el desarrollo de los signos clínicos. Una causa que se asocia con la pérdida de peso es la elevada concentración del factor de necrosis tumoral (TNF- α , catequina), el cual promueve el catabolismo en los tejidos. El curso clínico toma generalmente 3-6 meses finalizando con la muerte del animal. Los animales afectados pueden ser categorizados en 4 grupos de acuerdo a los signos clínicos, la diseminación de la bacteria por la materia fecal y la respuesta inmunológica.

-En el primer estadio (**infección silente**) no se encuentran los signos clínicos ni la diseminación bacteriana ni anticuerpos circulantes detectables.

-En el segundo estadio (**infección subclínica**) el animal podría diseminar escasas bacterias difíciles de detectar, no presenta signos clínicos e inmunológicamente podría ser anormal (detección de inmunidad mediada por células).

Enfermedades sistémicas o multiorgánicas (2da parte)

Curso de Enfermedades de los rumiantes y cerdos.

Dr. Gabriel Eduardo, Travería

Dra. María Fiorella, Alvarado Pinedo.

-En el tercer estadio (**enfermedad clínica**) los animales pierden peso en forma gradual y tienen diarrea acuosa al principio intermitente. En este estadio usualmente se detectan las bacterias y los anticuerpos. La mayoría de los animales si no se eliminan del rodeo pasan al siguiente estadio.

-En el cuarto estadio (**enfermedad clínica avanzada**) se caracteriza por diarrea acuosa, emaciación y edema submandibular. Eliminan abundantes cantidades de bacterias y generalmente tienen elevada cantidad de anticuerpos y escasa o nula respuesta celular.

Patología

Los hallazgos macroscópicos más importantes son enteritis crónica, linfangitis intestinal crónica con adenopatía de los nódulos linfáticos mesentéricos. Las lesiones más prominentes se encuentran en la parte distal del íleon hasta la válvula ileocecal. La mucosa intestinal generalmente se encuentra engrosada y corrugada con los vasos linfáticos de la serosa prominentes y dilatados.

Las lesiones microscópicas pueden ser leves, con escasas células gigantes tipo Langhans diseminadas en la lámina propia o en las áreas paracorticales de los ganglios linfáticos y células epiteloides con citoplasma intensamente eosinofílico. Las lesiones moderadas consisten en pequeños grupos de macrófagos y células gigantes en la lamina propia y la submucosa intestinal, estas células también se pueden encontrar en los ganglios linfáticos en los senos subcapsulares y en el área paracortical. Las lesiones severas consisten en muchos macrófagos y células gigantes diseminadas por el tejido conectivo de la submucosa, la túnica muscular y la serosa. Las criptas glandulares se encuentran distendidas con neutrófilos polimorfonucleares y material mucoso. En las lesiones leves casi no se encuentran bacilos ácido alcohol resistente a la coloración de Ziehl Neelsen, pero en la medida en que las lesiones se agravan las bacterias intracelulares se incrementan. No se observa necrosis como las que se pueden dar en otras especies.

Patogénesis

Después de la infección oral con *Mycobacterium avium* subsp *paratuberculosis*, la bacteria infecta los macrófagos intestinales. Una característica importante de la paratuberculosis es la persistencia de la micobacteria dentro de las células con escaso desarrollo de lesiones. Como estos eventos son similares en otras micobacteriosis como

Enfermedades sistémicas o multiorgánicas (2da parte)

Curso de Enfermedades de los rumiantes y cerdos.

Dr. Gabriel Eduardo, Travería

Dra. María Fiorella, Alvarado Pinedo.

la lepra y la tuberculosis muchos de los conceptos derivados de estas enfermedades también se aplican en paratuberculosis.

- Ingreso a las células: Después de ser ingerida la micobacteria toma contacto con la fibronectina contenida en la bilis al pasar por el duodeno, se fija a proteínas receptoras de fibronectina ubicadas en la pared bacteriana. En el intestino delgado, es internalizada por las células M ubicadas en el tejido linfático asociado a las mucosas, el ingreso puede estar facilitado por receptores opsonizantes a través del complemento, o no opsonizantes como CD14 receptor del complejo de lipopolisacárido y de la proteína de unión al lipopolisacrido, MHC, fibronectina, una glicopretina de gran tamaño encontrada comúnmente en el plasma y en la matriz extracelular con muchas propiedades biológicas, vitronectina y receptores fucosil/manosil, fibrina, gelatina y colágeno favoreciendo la adhesión e ingreso de la micobacteria a las células M, con preponderancia de las placas de Peyer ubicadas en el ileon. Tanto las bacterias intactas como las degradadas son transportadas en el interior de las vacuolas a través de las células M a los macrófagos que se encuentran en las áreas subepiteliales e intraepiteliales de las placas de Peyer.

El macrófago intestinal es la célula blanco de *Mycobacterium avium* subsp *paratuberculosis*.

- Interacción del macrófago con la micobacteria: Después de ser ingerido por el macrófago, la micobacteria se enfrenta a los mecanismos degradativos. Estos mecanismos incluyen la fusión del fagosoma con el lisosoma (fagolisosomas), el estallido respiratorio con la formación de radicales de oxígeno y óxido nítrico con actividad antimicrobiana, las defensas no oxidativas como proteínas catiónicas, lisosima y otras enzimas lisosomales. Los estudios con microscopía electrónica lo ubican dentro del fagosoma, en las primeras 2-8 horas se encuentran escasas micobacterias en el interior de los fagosoma algunas de las cuales parecen degradadas y, a medida que avanza el tiempo: 24 h., se incrementa el número bacteriano hasta encontrar numerosas bacterias dentro de los fagosomas.

Para que se produzca la enfermedad, la bacteria debe sobrevivir a estos mecanismos de muerte intracelular y multiplicarse. Los mecanismos de la micobacteria para sortear el arsenal enzimático del macrófago incluyen: evitar la unión del fagosoma con el lisosoma mediante la producción de sulfátidos, escape del fagosoma dentro del citoplasma, evitar la producción de óxido nítrico a través de los glicolípidos, inhibir

Enfermedades sistémicas o multiorgánicas (2da parte)

Curso de Enfermedades de los rumiantes y cerdos.

Dr. Gabriel Eduardo, Travería
Dra. María Fiorella, Alvarado Pinedo.

el estallido respiratorio con la subperóxidodismutasa y los glicolípidos. El lipoarabinomanano de la pared celular induce resistencia a la activación macrofágica.

Desarrollo de la lesión e inmunidad

La genética, la micobacteria y los factores ambientales inevitablemente tienen influencia en el curso de la infección, pero la respuesta inmune del hospedador parece tener un rol prominente en la patogénesis de la paratuberculosis. La evidencia acumulada sugiere que las primeras lesiones se desarrollan en el tejido linfático de las placas de Peyer. Luego la lesión se disemina desde este lugar a la porción terminal del íleon. Las lesiones primitivas en el área interfolicular de las placas de Peyer son potencialmente significantes por el rol de esta región en el desarrollo del sistema inmune. En los rumiantes las placas de Peyer son responsables de la linfopoyesis de los linfocitos B, y a diferencia de las placas del jejunio, las del íleon contienen muchos folículos ricos en linfocitos B, con poco espacio para las áreas interfoliculares que son ricas en linfocitos T. Las placas de Peyer del íleon contienen 1-2% de células T cuando se las compara con las placas del jejunio las que contienen un 30-50% de células T. Esta escasez potencial de células T capaces de modular el sistema inmune, sugiere que las placas de Peyer, las cuales adquieren su máximo desarrollo en el rumiante joven, son un medio ambiente relativamente favorable para las micobacterias de vida intracelular.

También existe una tolerancia inmune local a los microorganismos; esta tolerancia puede ser responsable del establecimiento de infecciones en las placas de Peyer. Esta tolerancia se ve reflejada en la colonización de micobacterias saprófitas que suelen poblar la porción terminal del íleon en los rumiantes.

Es posible que la resistencia a la infección que se va adquiriendo con la edad tenga que ver con la involución concomitante de las placas del íleon, desapareciendo el ambiente favorable para la persistencia de las micobacterias.

A pesar de las deficiencias del hospedador, la mayoría de los animales que naturalmente se exponen a la infección no desarrollan la enfermedad; posiblemente estos animales eliminen la infección mediante una respuesta intracelular adecuada y sean resistentes a la infección, después de desarrollar escasas lesiones.

Los factores que tienen influencia en estos resultados probablemente son: la dosis y vía de infección, la virulencia de la cepa, el estatus inmunológico local y sistémico, los genes de resistencia del hospedador que regulan la presentación antigénica y la respuesta intracelular, también los factores del medio ambiente. La persistencia de

Enfermedades sistémicas o multiorgánicas (2da parte)

Curso de Enfermedades de los rumiantes y cerdos.

Dr. Gabriel Eduardo, Travería
Dra. María Fiorella, Alvarado Pinedo.

escasos números de bacterias intracelulares, se podría reflejar en un equilibrio entre las defensas del hospedador y la resistencia de la bacteria originando casos subclínicos. La progresión de los casos subclínicos a través de los meses o años de incubación a formas clínicas multibacilares de paratuberculosis, se puede deber al debilitamiento o la supresión de la inmunidad mediada por células, esta causa sería la responsable de la proliferación micobacteriana y su eliminación por la materia fecal.

Inmunidad mediada por células

Cuando un microorganismo ingresa a un organismo, este responde con sistemas inmunes innatos o adaptativos. Por un lado, se encuentran los factores solubles como la lisosima y el complemento que junto con las células fagocíticas forman el sistema inmune innato, por el otro se encuentran los linfocitos B productores de anticuerpos (inmunidad humoral) y los linfocitos T (inmunidad celular) formando el sistema inmune adaptativo. Las células T son las encargadas de activar los macrófagos y así eliminar los patógenos intracelulares. La expansión clonal de células T específicas depende del reconocimiento del antígeno presentado por los macrófagos u otras células presentadoras de antígeno a través de los receptores apropiados. Las células presentadoras de antígeno presentan en su superficie moléculas como las del complejo mayor de histocompatibilidad tipo I y II relacionadas mayoritariamente a la presentación de proteínas. Las moléculas de superficie CD1b presentan los antígenos lipídicos. Las células T presentan distintos receptores, estos receptores se conocen como receptores de células T (T Cell Receptor, TCR) así tenemos receptores de células T tipo $\gamma\delta$ y otros $\alpha\beta$ (TCR $\gamma\delta$, TCR $\alpha\beta$). En las infecciones micobacterianas son importantes las células T $\alpha\beta$, con sus subpoblaciones que expresan los marcadores de grupo (cluster of differentiation, CD) CD4 (ayudantes) y CD8 (supresora, contrasupresora) y también las células T $\gamma\delta$. En particular las células T CD4 también conocidas como células ayudantes (Helper) a su vez presentan subpoblaciones de células ayudantes tipo 1 (TH1), ayudantes tipo 2 (TH2), Folicular helper (Tfh), Th17 y T reguladoras. Esta diferenciación de ayudantes se realiza por el perfil de citocinas (también conocidas como interleucinas, IL) que mayoritariamente libera cada una de ellas. Así, tenemos que los TH1 secretan IFN- γ , IL-2 y IL-12, estas células están comprometidas en la activación macrofágica y en la hipersensibilidad de tipo retardada (HTR). Las células ayudantes tipo 2 liberan IL-4, IL-5, IL-10, y asisten en la inmunidad de mucosa,

Enfermedades sistémicas o multiorgánicas (2da parte)

Curso de Enfermedades de los rumiantes y cerdos.

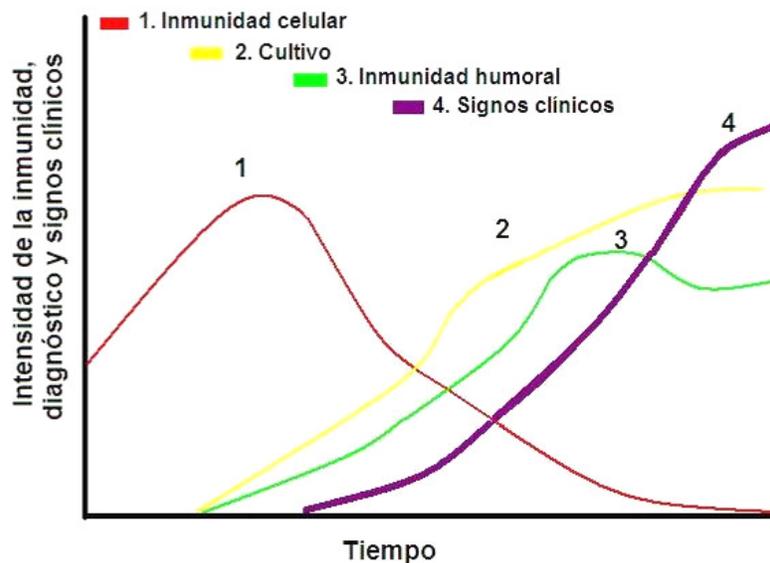
Dr. Gabriel Eduardo, Travería
Dra. María Fiorella, Alvarado Pinedo.

principalmente en infecciones por parásitos y en presencia de alérgenos. Las Tfh asisten al desarrollo de células B y la producción de anticuerpos en los folículos linfoides; mediando la colaboración T-B en la producción de anticuerpos de alta afinidad y producción de memoria.

Las subpoblaciones de linfocitos TH1 y Tfh tienen funciones antagónicas: cuando una de ellas se selecciona, actúa inhibiendo el desarrollo de la otra. Las IL-4 y IL-5 suprimen las respuestas TH1, el IFN- γ actúa contra la respuesta de Tfh.

La respuesta a TH1 se asocia con producción de IFN- γ , reacción de hipersensibilidad tipo retardada y reducido número de micobacterias; una respuesta Tfh se asocia con baja producción de IFN- γ , elevadas concentraciones de anticuerpo y altas cargas bacterianas. A medida que la paratuberculosis progresa, la inmunidad mediada por células que al principio es fuerte, va declinando, y los anticuerpos se elevan. Al principio de la enfermedad la inmunidad mediada por células se puede detectar por pruebas como la proliferación de linfocitos y la reacción de tuberculina. Las reacciones de hipersensibilidad en la piel que al principio son positivas, se van negativizando en los animales con enfermedad avanzada (Fig 1). Con microscopía electrónica se puede observar una relación de bacterias dañadas y en escaso número en los animales que reaccionan en forma positiva a la prueba intradérmica, e inversamente, los animales que tienen escasa reacción a las pruebas tuberculínicas tienen muchas micobacterias intracelulares, demostrando la falla en los mecanismos de muerte intracelular.

Figura 1: Progresión de la inmunidad celular, humoral, signos y cultivo. Adaptado de Chiodini, 1984.



Enfermedades sistémicas o multiorgánicas (2da parte)

Curso de Enfermedades de los rumiantes y cerdos.

Dr. Gabriel Eduardo, Travería

Dra. María Fiorella, Alvarado Pinedo.

Los linfocitos T CD8 se activan cuando los antígenos se presentan junto con el complejo mayor de histocompatibilidad tipo I, tienden a acumularse en la periferia de las lesiones granulomatosas en donde ejercerían una función inmunodepresora. Las subpoblaciones de linfocitos $T\gamma\delta$ se acumulan al principio de la infección, para limitar el daño potencial que pudieran causar los linfocitos T CD4. Los linfocitos $T\gamma\delta$ se localizan en las superficies epiteliales y pueden activarse con el complejo mayor de histocompatibilidad I o II, incluso pueden activarse en ausencia del complejo mayor de histocompatibilidad. Estas poblaciones se pueden activar con las proteínas de choque térmico (hsp 60), y pueden suprimir a los CD4. Las poblaciones de linfocitos $T\gamma\delta$ y CD8 responden preferentemente a los antígenos solubles, mientras que los linfocitos T CD4 reaccionan a los antígenos de la pared celular. Los linfocitos $T\gamma\delta$ suprimirían a los linfocitos T CD4 con actividad citotóxica. Las células T CD8 (contrasupresoras) actuarían suprimiendo a los linfocitos $T\gamma\delta$ asistiendo a la proliferación de los linfocitos T CD4.

Inmunidad humoral

La respuesta humoral en paratuberculosis parece tener una relación inversa con la respuesta mediada por células. En el curso de la infección, las concentraciones serológicas de anticuerpos se incrementan precedidas por la inmunidad medida por células. Estos anticuerpos se pueden detectar por pruebas como la fijación de complemento, la inmunodifusión en gel de agar y mediante la técnica de ELISA. A medida que la inmunidad mediada por células se debilita, proliferan las bacterias intracelulares y comienza la producción de anticuerpos; esto ocurre muchos meses después de la infección, cuando las células infectadas se lisan y liberan los antígenos (Fig 1). Si embargo esta respuesta humoral es de escaso valor contra las micobacterias que aún permanecen dentro de las células. De esta forma los casos clínicos con lesiones multibacilares, tienden a tener altas concentraciones de anticuerpos. En el suero se encuentran respuestas de inmunoglobulinas G, M y escasa respuesta de Ig A. Por estudios con inmunohistoquímica se demostró un incremento en el intestino de células productoras de Ig M y G pero no de células productoras de Ig A. Algunos autores sugieren que los anticuerpos locales pueden producir reacciones de hipersensibilidad

Enfermedades sistémicas o multiorgánicas (2da parte)

Curso de Enfermedades de los rumiantes y cerdos.

Dr. Gabriel Eduardo, Travería
Dra. María Fiorella, Alvarado Pinedo.

inmediata con liberación de histamina y de esta manera colaborar con las lesiones entéricas.

Diagnóstico

El término diagnóstico cuando se utiliza asociado a la palabra “test” significa que la decisión de positivo (enfermo/infectado) o negativo (no infectado/no enfermo) se basa en el resultado de una prueba.

En un programa de control de paratuberculosis exitoso el primer paso es la identificación de los animales infectados. El diagnóstico de la enfermedad en los animales vivos se basa en los síntomas clínicos, reacciones inmunológicas e identificación del agente etiológico. El diagnóstico en el animal clínicamente enfermo con síntomas típicos y grandes cantidades de micobacterias eliminándose por materia fecal usualmente es relativamente sencillo. El desafío radica en la identificación de los animales enfermos que no demuestran signología en donde el diagnóstico es más dificultoso, dado a que eliminan pocas bacterias en forma intermitente y normalmente son negativos a los tests que detectan anticuerpos. Estos animales constituyen el principal factor de riesgo para la permanencia de la enfermedad exigiendo la mayor sensibilidad y especificidad posible a las pruebas diagnósticas.

Métodos bacteriológicos: Se puede poner en evidencia la presencia de la micobacteria con la coloración de Ziehl Neelsen. El cultivo de materia fecal es un método muy específico, en la paratuberculosis bovina se la considera como la técnica estándar de oro. Como contrapartida es costoso y de ejecución laboriosa, requiere de por lo menos 12 a 16 semanas de incubación para la formación de colonias visibles en medios sólidos. Las muestras clínicas como la materia fecal y la mucosa intestinal normalmente están altamente contaminadas y requieren ser descontaminadas antes de ser sembradas en medios especializados. Los métodos de descontaminación son críticos en la recuperación del agente, estos métodos deben ser inocuos para la micobacteria y a la vez suprimir el desarrollo de los microorganismos contaminantes. Entre los agentes descontaminantes más usados están: el cloruro de hexadecil piridinium al 0,75%, cloruro de benzalconio al 1%, ácido oxálico al 5% y el hidróxido de sodio al 4%.

Se pueden reducir los tiempos de incubación con el cultivo radiométrico y la confirmación con técnicas de PCR para la detección de IS900. La sensibilidad del cultivo puede llegar al 50% y su especificidad es del 100%.

Enfermedades sistémicas o multiorgánicas (2da parte)

Curso de Enfermedades de los rumiantes y cerdos.

Dr. Gabriel Eduardo, Travería
Dra. María Fiorella, Alvarado Pinedo.

Métodos basados en genética molecular: Desde el descubrimiento de la secuencia de inserción específica IS900 se han diseñado técnicas de PCR para ser aplicadas a muestras clínicas. Estos métodos son más veloces que los métodos de cultivo estándar pero carecen de sensibilidad por la presencia de sustancias inhibitoras de PCR en las muestras clínicas y la presencia de la yema de huevo en los medios de cultivo, también permiten detectar formas bacterianas con pared deficiente. La secuencia de inserción IS900 es considerada específica para *Mycobacterium avium* subsp *paratuberculosis* pero algunas micobacterias tienen secuencias de inserción similares a IS900 y pueden dar reacciones positivas, estos problemas parecen centrarse en problemas con algunos cebadores de PCR. Estos problemas se pueden solucionar mediante el análisis de los polimorfismos de extensión de los fragmentos de restricción (RFLP), estos polimorfismos se ponen en evidencia hibridizando con la secuencia de inserción IS900. Esta prueba permite diferenciar cepas de *Mycobacterium avium* subsp *paratuberculosis* previamente identificadas con PCR, esta diferenciación de cepas es muy útil para la realización de estudios epidemiológicos.

Diagnóstico patológico: Las lesiones macroscópicas observadas son bastantes características aunque no conclusivas. La histopatología es un método de diagnóstico sensible y las lesiones características se pueden observar en los primeros estadios de la enfermedad, es una técnica laboriosa y requiere del análisis de varias muestras para detectar las lesiones escasas. También se necesita confirmar el diagnóstico mediante la puesta en evidencia del agente causal. Las tinciones con el método de Ziehl-Neelsen pueden dar resultados negativos cuando los gérmenes son escasos o cuando se encuentran bacterias con pared deficiente.

Inmunohistoquímica: La micobacteria se puede poner en evidencia mediante la visualización en cortes de tejidos incluidos en parafina con los métodos de inmunohistoquímica usando sueros monoclonales o policlonales.

Pruebas inmunológicas: Hay muchas pruebas inmunológicas que pueden ser usadas para el diagnóstico de paratuberculosis con sus limitaciones. El diagnóstico de rutina más utilizado para la detección de los animales enfermos es el ELISA También se siguen utilizando la fijación de complemento y la inmunodifusión. Considerando la evolución de la inmunidad en la enfermedad, estos métodos prestan su mayor utilidad en los estados clínicos de la enfermedad. Los animales subclínicos presentan bajos niveles de anticuerpos circulantes. Tomando en cuenta esto la sensibilidad de la prueba

Enfermedades sistémicas o multiorgánicas (2da parte)

Curso de Enfermedades de los rumiantes y cerdos.

Dr. Gabriel Eduardo, Travería

Dra. María Fiorella, Alvarado Pinedo.

de ELISA puede variar desde el 90% en animales con enfermedad clínica hasta el 15% en los animales con enfermedad subclínica. Como *Mycobacterium avium* subsp *paratuberculosis* comparte muchos antígenos con otras micobacterias que se encuentran ampliamente distribuidos en la naturaleza se pueden dar falsos positivos. Una forma de disminuir estas reacciones es la preabsorción del suero con *Mycobacterium phlei* para eliminar los anticuerpos de reactividad cruzada a pesar de esta absorción los animales con tuberculosis siguen dando en forma positiva.

Inmunidad Humoral: Las pruebas que se pueden utilizar para detectar anticuerpos en paratuberculosis pueden ser: fijación de complemento, ELISA en suero, ELISA en leche, inmunodifusión, dot-ELISA y inmunoblotting (western-blot), siendo ELISA e inmunodifusión las pruebas más usadas.

ELISA: El principio fundamental del ELISA, a partir del cual se deriva su nombre, es la emisión de una señal a partir de una enzima para demostrar que se ha producido una unión antígeno anticuerpo y en que proporción. Todos los ELISA están compuestos por tres componentes, el sistema de captura, los analitos (las sustancias a ser detectadas y para las cuales se ha diseñado el ELISA) y el sistema de detección.

Respecto a las variaciones en la inmunidad humoral Nielsen, explica como varían los resultados de la técnica de ELISA con respecto a las pariciones sucesivas de los animales afectados, si bien algunos animales pueden ser positivos al primer parto las probabilidades de dar positivo son máximas a partir del segundo parto en adelante. También se encuentran variaciones a lo largo de la lactación, con un patrón inversamente proporcional entre las concentraciones de los anticuerpos en el suero con respecto a los del calostro, indicando un cambio en la concentración de anticuerpos a lo largo de la lactación. Estos casos son limitados a bajos puntos de corte en el ELISA, indicando que los animales con pocos anticuerpos se encuentran infectados pero con una predominancia de respuesta celular. Desde el punto de vista diagnóstico es importante utilizar diferentes puntos de corte en la interpretación del ELISA en diferentes pariciones y en diferentes estados de lactación.

Inmunodifusión: La inmunodifusión es una técnica que presenta menor sensibilidad que ELISA. Es una prueba rápida, tecnológicamente simple, de bajo costo, y eficiente cuando el clínico debe confirmar los casos clínicos sospechosos de paratuberculosis en animales que tienen diarrea y pérdida de peso. Otra ventaja es que se pueden detectar anticuerpos de distintas especies sin la necesidad de realizar cambios en los reactivos.

Enfermedades sistémicas o multiorgánicas (2da parte)

Curso de Enfermedades de los rumiantes y cerdos.

Dr. Gabriel Eduardo, Travería
Dra. María Fiorella, Alvarado Pinedo.

La sensibilidad y especificidad es correcta cuando se trata de ovinos y caprinos, en ganado bovino se observa una mayor proporción de falsos negativos.

Inmunidad celular:

Tuberculina: La necesidad de detectar los animales con enfermedad subclínica ha focalizado el interés en las respuestas inmunes celulares. El más antiguo de los métodos es la reacción tuberculínica la cual detecta el incremento en el grosor de la piel consecuentemente a la reacción de hipersensibilidad de tipo retardado después de inocular el antígeno por la vía intradérmica. A esta prueba se la considera poco específica en paratuberculosis, aunque actualmente se está estudiando la posible utilidad del uso de la PPD Aviar en el diagnóstico temprano de esta enfermedad en animales jóvenes.

Prueba de Interferón gamma: Otras pruebas inmunológicas basadas en la inmunidad celular alternativas a la tuberculina, son la proliferación de linfocitos y la prueba de interferón gamma. La prueba de interferón gamma está diseñada para detectar la producción de IFN- γ en sangre entera suprimiendo la necesidad de aislar los linfocitos. Las células T previamente sensibilizadas que reconocen antígenos específicos en este caso PPD, liberan después de 24 horas de incubación IFN- γ , este interferón es detectado en un ELISA sandwich compuesto por anticuerpos monoclonales anti interferón gamma. Originalmente la prueba se utilizó en tuberculosis y luego en paratuberculosis. Actualmente existen “kits” diagnósticos comerciales basados en estos principios que usan como antígenos PPD aviar y bovino para ser usados en forma comparada para la detección de las dos enfermedades.

Control

El principal obstáculo es el período de incubación extremadamente largo y la gran proporción de animales enfermos subclínicos dificultosos de detectar mediante los métodos de detección actuales. Las medidas deberían apuntar a evitar la diseminación de la enfermedad en los rodeos libres de paratuberculosis. El mayor factor de riesgo es la introducción de nuevos animales dentro del rodeo. Las pruebas diagnósticas son a menudo insuficientes para detectar el verdadero estado infeccioso de un animal individual. Por lo tanto es necesario conocer el status de infección de todo el rodeo de origen de los animales que ingresan. Para lograr con este objetivo es necesario repetir las pruebas diagnósticas en la totalidad del rodeo.

Enfermedades sistémicas o multiorgánicas (2da parte)

Curso de Enfermedades de los rumiantes y cerdos.

Dr. Gabriel Eduardo, Travería
Dra. María Fiorella, Alvarado Pinedo.

En los rodeos en donde se encuentra la enfermedad es importante minimizar su difusión. Los animales de mayor edad diseminadores de la micobacteria y los emaciados deben ser eliminados del rodeo. El riesgo de infección es máximo en los animales jóvenes, por lo tanto es crucial un buen manejo de los recién nacidos en lo que respecta al medio ambiente. Los terneros deben ser separados de los adultos inmediatamente después de nacidos, solo deberían tomar calostro de sus propias madres o de animales libres de la enfermedad.

Tratamiento

Por el momento los tratamientos de la enfermedad son muy caros y de dudosa eficacia, solo se intentan en los casos en donde se quieran prolongar la vida de animales de mucho valor. Las drogas más usadas son la clofazimina o isoniazida y la rifabutina o etambutol seguidos de dosis diarias de isoniazida durante toda la vida. *Mycobacterium avium* subsp *paratuberculosis* presenta susceptibilidad *in vitro* a las siguientes drogas: D-cycloserina, etambutol, amicacina, claritromicina, rifabutina y las fluoroquinolonas experimentales Bay y 3118. Los tratamientos en paratuberculosis pueden fracasar, por los inconvenientes que deben sortear las drogas para penetrar al interior de los macrófagos.

Vacunación

El uso de la vacunación es un tema controvertido y aumenta los reactores a pruebas serológicas y alérgicas haciendo imposible diferenciar otras infecciones micobacterianas como la tuberculosis. La vacunación es más efectiva cuando los animales se vacunan antes de los 60 días de vida. Si bien la vacunación no impide la infección disminuye los signos clínicos.

Bibliografía

1. BECH-NEELSEN, S.; BURIANEK, L.L.; SPANGLER, E.; HEIDER, E.L.; HOFFSIS, G.F.; DORN, R.C. (1985) Characterization of *Mycobacterium paratuberculosis* antigenic proteins. *Am J Vet Res* 46: 2418-2420.
2. BECH-NIELSEN, S.; JORGENSEN, J.B.; AHRENS, P.; FELD, N.C. (1992) Diagnostic Accuracy of a *Mycobacterium phlei*-Absorbed Serum Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for Diagnosis of Bovine Paratuberculosis in Dairy Cows. *J of Clin Microbiol* 30: 613-618.
3. BERNARDELLI, A.; NADER, A. (1992) Diagnóstico de Paratuberculosis Bovina con Tuberculina Aviar o Johnina. *Vet Arg* 9: 164-168.

Enfermedades sistémicas o multiorgánicas (2da parte)

Curso de Enfermedades de los rumiantes y cerdos.

Dr. Gabriel Eduardo, Travería
Dra. María Fiorella, Alvarado Pinedo.

4. BILLMAN-JACOB, H.; CARRIGAN, M.; COCKRAM, F.; CORNER, L.A.; GILL, I.J.; HILL, J.F.; JESSEP, T.; MILNER, A.R.; WOOD, P.R. (1992) A comparison of the interferon gamma assay with the absorbed ELISA for the diagnosis of John's disease in cattle. *Aust Vet Journ* 69: 25-28.
5. BROOKS, B.W.; YOUNG, N.M.; WATSON, D.C.; ROBERTSON, R.H.; SUGDEN, E.A.; NIELSEN, K.H.; BECKER, S.A.W.E. (1991) Mycobacterium paratuberculosis Antigen D: Characterization and Evidence That It is a Bacterioferritin J of *Clin Microbiol* 29: 1652-1658.
6. CAMPHAUSEN, R. T.; JONES, R. L.; BRENNAN, P. J. (1988) Antigenic relationship between Mycobacterium paratuberculosis and Mycobacterium avium. *Am J Vet Res* 49: 1307-1310.
7. CHIODINI, R. (1993) The History of Paratuberculosis (John's disease): a review of the literature 1895 to 1992. *The International Association for Paratuberculosis, Inc eds. pp I-III.*
8. CHIODINI, R.; VAN KRUNINGEN, H.J.; MERKAL, R.S. (1984) Ruminant paratuberculosis (John's disease) The current status and future prospects. *Cornell Vet* 74: 218-262.
9. CHIODINI, R.; VAN KRUNINGEN, H.J.; THAYER, W.R.; COUTU, A. (1986). Spheroplastic Phase of Mycobacterial Isolated from Patients with Crohn's Disease. *J of Clin Microbiol* 24: 357-363.
10. CHIODINI, R.J. (1996) Immunology: Resistance to Paratuberculosis. *Vet Clin of North Am: Food Animal Practice* 12: 313-343.
11. CICUTA, M.E.; BOEHRINGER, S.I.; ROIBON, W.R.; BERNARDELLI, A.; BAKOS, E.; BENITEZ, M.C.; KUNERT, J.A.; ARAGON L.R. (1995) Paratuberculosis in cattle and sheep of the North East of Argentina. *The Paratuberculosis Newsletter* 7: 18-23.
12. CLARKE, C. (1994) Host responses to Mycobacterium paratuberculosis/M. avium infection *Proceedings of the Fourth International Colloquium on Paratuberculosis UK July 17-21: 345-365.*
13. CLARKE, C.J. (1997) The Pathology and Pathogenesis of Paratuberculosis in Ruminants and Other Species. *J Comp Path* 116: 217-261.
14. COLLINS, D.M.; GABRIC, D.M.; DE LISLE, G.W. (1990) Identification of Two Groups of Mycobacterium paratuberculosis Strains by Restriction Endonuclease Analysis and DNA Hybridization. *J of Clin Microbiol* 28: 1591-1596.
15. COLLINS, D.M.; STEPHENS, D.; DE LISLE, G.W. (1993) Comparison of polymerase chain reaction tests and fecal culture for detecting Mycobacterium paratuberculosis in bovine faeces. *Veterinary Microbiology* 36: 289-299.
16. COLLINS, M.T. (1994) Clinical approach to control of bovine paratuberculosis. *JAVMA* 204: 208-210.
17. COLLINS, M.T. (1996) Diagnosis of paratuberculosis. *Vet Clin of North Am : Food Animal Practice* 12:357-371.
18. COLLINS, M.T.; HOIBY, N.; JORGENSEN, J.B.; BERCOVIER, H.; LAMBRECHT, R.S.; JORGENSEN, E. (1991) Crossed immunoelectrophoretic analysis of Mycobacterium paratuberculosis. *APMIS* 99: 83-92.
19. COX, J.C.; DRANE, D.P.; JONES, S.L.; RIDGE, S.; MILNER, A.R. (1991) Development and evaluation of a rapid absorbed enzyme immunoassay test for the diagnosis of John's disease in cattle. *Australian Veterinary Journal* 68: 157-160.
20. DE KESEL, M.; GILOT, P.; COENE, M.; COCITO, C. (1992) Composition and Immunological Properties of the Protein Fraction of A36, a Major Antigen Complex of Mycobacterium paratuberculosis. *Scand J Immunol* 36: 201-212.
21. EAMENS, G.J.; WHITTINGTON, R.J.; MARSH, I.B., TURNER, M.J.; SAUNDERS, V.; KEMSLEY, P.D.; RAYWARD, D. (2000) Comparative sensitivity of various faecal culture methods and ELISA in dairy cattle herds with endemic John's disease. *Vet microbiol* 77: 357-367.
22. FRANCIS, J.; SEILER, R.J.; WILKIE, I.W.; O'BOYLE, D.; LUMSDEN, M.J.; FROST, A.J. (1978) The sensitivity and specificity of various tuberculin tests using bovine PPD and other tuberculins. *The Vet Record* 4: 420-425.

Enfermedades sistémicas o multiorgánicas (2da parte)

Curso de Enfermedades de los rumiantes y cerdos.

Dr. Gabriel Eduardo, Travería
Dra. María Fiorella, Alvarado Pinedo.

23. GILOT, P.; DE KESEL, M.; COENE, M.; COCITO, C. (1992) Induction of Cellular Immune Reactions by A36, antigen Complex of Mycobacterium paratuberculosis: Comparison of A36 and Johnin Components. *Scand J Immunol* 36: 811-821.
24. GODFREY, H.P. (1993) T cell fibronectin and mycobacterial adversarial strategy. *Int J Clin Lab Res* 23: 121-123.
25. GUNNARSSON, E.; FODSTAD, F.H. (1979) Analysis of Antigen in Mycobacterium paratuberculosis . *Acta Vet Scand* 20: 200-215.
26. HARRIS, N. B. AND BARLETTA, R.G. (2001) Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis in Veterinary Medicine. *Clin Microbiol Review* 14: 489-512.
27. HINES, M.E.; AND SNIDER, T.G. (1991) Mycobacterial glycolipid fractions inhibit activated macrophages. *Proc of the Third Int Coll on Paratuberculosis*. 355-370
28. JACOBSON, R.H. (1998) Validation of serological assays for diagnosis of infectious diseases. *Rev sci tech Off int Epiz* 17 (2): 469-486.
29. JARK, U.; RINGENA, I.; FRANZ, B.; GERLACH, G.F.; BEYERBACH, M.; FRANZ, B. (1997) Development of an ELISA technique for serodiagnosis of bovine paratuberculosis. *Vet Microbiol* 51: 189-198.
30. JORGE, M.C. (1988) Serological Studies on Johne's Disease in a Dairy Herd by ELISA During Three Years Period. *Proceeding of Second International Colloquium on Paratuberculosis* pp: 52-57.
31. JUSTE, R.A.; MARCO, J.C.; SAEZ DE OCARIZ, C. And ADURIZ, J.J. (1991) Comparison of different media for the isolation of small ruminant strains of Mycobacterium paratuberculosis. *Vet Microbiol* 28: 385-390.
32. KALIS, C.H.J.; BENEDICTUS, G.; VAN WEERING, H.J.; FLAMAND, F.; HAAGSMA, J. (1991) Experiences with the use of an experimental vaccine in the control of paratuberculosis in The Netherlands, Chiodini, R.J. and Kreeger, J.M., Ed. *Proceedings of the Third International Colloquium on Paratuberculosis* pp: 484-494.
33. KALIS, C.H.J.; HESSELINK, J.W.; RUSCHEN, E.W.; BARKEMA, H.W.; COLLINS, M.T.; VISSER, I.J.R. (1999) Factors influencing the isolation of Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis from bovine fecal samples. *J Vet Diagn Invest* 11: 345-351.
34. KOETS, A.; RUTTEN, V.; HOEKA; VAN MIL, F.; MÜLLER, K.; BAKKER, D.; GRUYS, E.; VAN EDEN, W. (2002) Progressive Bovine Paratuberculosis Is Associated with Local Loss of CD+ T Cells, Increased Frequency of $\gamma\delta$ T Cells, and Related Changes in T-Cell Function. *Infec and Immun* 70: 3856-3864.
35. KOETS, A.P.; RUTTEN, V.P.M.G.; DE BOER, M.; BAKKER, D.; VALENTIN-WEIGAND, P.; VAN EDEN, W. (2001) Differential Changes in Heat Shock Protein-, Lipoarabinomannan-, and Purified Protein Derivative-Specific Immunoglobulin G1 and G2 Isotype Responses during Bovine Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis Infection. *Infec and Immun* 69: 1492-1298.
36. KOETS, A.P.; RUTTEN, V.P.M.G.; HOEK, A.; BAKKER, D.; VAN ZIJDERVELD.; MULLER, K.E.; VAN EDEN, W. (1999) Heat-shock protein-specific T-cell responses in various stages of bovine paratuberculosis. *Vet Immun and Immunophat* 70: 105-115.
37. KORMENDY, B. (1988) Diagnostic value of mammalian, avian and Johnin PPD tuberculins in cattle herds infected by Mycobacterium paratuberculosis. *Acta Vet Hung* 36: 177-183.
38. LAEMMLI, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685.
39. LARSEN, A.B.; JOHNSON, H.W. (1949) Studies on Johnin. 7. Frequency of Intradermal Testing as Related to Local Desensitization. *Am J Vet Res* 10: 344-346.
40. LISBY, G.; ANDERSEN, J.; ENGBAER, K.; BINDER. (1994) Mycobacterium paratuberculosis in Intestinal Tissue from Patients with Crohn's Disease Demonstrated by a Nested Primer Polymerase Chain Reaction. *Scand J Gastroenterol* 29: 923-929.
41. LOPEZ, B.; RITTACCO, I.N.; KANTOR, R.; DEBENEDETTI, R.; NADER, A.; AND BERNARDELLI, A. (1990) Evaluation of an ELISA for the serodiagnosis of bovine paratuberculosis. *The Paratuberculosis Newsletter* 2: 5-6.

Enfermedades sistémicas o multiorgánicas (2da parte)

Curso de Enfermedades de los rumiantes y cerdos.

Dr. Gabriel Eduardo, Travería
Dra. María Fiorella, Alvarado Pinedo.

42. LOWRIE, D.B.; ANDREW, P.W. (1988) Macrophage antimycobacterial mechanisms. *Brit Med Bull* 44: 624-634.
43. MASONE, A.R.; ITAGAKI, S.; KUNIO, D.; and GIMENO, E.J. (1991) Lectin histochemical Study on Normal and Paratuberculosis-Affected Bovine Ileum. *J Vet Med Sci* 53: 761-763.
44. MASONE, A.R.; MARTIN, A.A.; IBARGOYEN, G.S. and GIMENO E.J. (1990) Immunohistochemical Methods for the Visualization of Mycobacterium paratuberculosis in Bovine Tissues. *J Vet Med B* 37: 251-253.
45. McDONALD, W.L.; RIDGE, S.E.; HOPE, A.F.; CONDRON, R.J. (1999) Detection of Mycobacterium paratuberculosis infected calves: Application of an absorbed enzyme immunoassay, bovine γ -interferon test, fecal culture and western blot. 270-279.
46. McDONALD, W.L.; RIDGE, S.E.; HOPE, A.F.; CONDRON, R.J. (1999) Evaluation of diagnostic tests for Johne's disease in young cattle. *Aust Vet J* 77: 113-119.
47. McNAB, W.B.; MEEK, A.H.; MARTIN, S.W.; DUNCAN, J.R. (1991) Associations between lipoarabinomannan enzyme-immuno-assay test results for paratuberculosis and farm-management factors. *Prev Vet Med* 13: 39-51.
48. MERKAL, R.S. AND CURRAN, B.J. (1974) Growth and Metabolic Characteristics of Mycobacterium paratuberculosis. *Applied Microbiology* 28: 276-279.
49. MERKAL, R.S.; MCCULLOUGH, W.G.; TAKAYAMA, K. (1981) Mycobactins The State of Art. *Bull Inst Pasteur* 79: 251-260.
50. MILNER, A.R.; LEPPER, A.W.D.; SYMONDS, W.N.; GRUNER, E. (1987) Analysis by ELISA and Western blotting of antibody reactivities in cattle infected with Mycobacterium paratuberculosis after absorption of serum with M phlei. *Rese in Vet Sci* 42: 140-144.
51. MOMONTANI, E.; WHIPPLE, D.L.; THIERMANN, A.B.; CHEVILLE, N.F. (1988) Role of M cells and macrophages in the entrance of Mycobacterium paratuberculosis into domes of ileal Peyer's patches in calves. *Vet Pathol* 25: 131-137.
52. MOREIRA, A.R.; PAOLICCHI, F.; MORSELLA, C.; ZUMARRAGA, M.; CATALDI, A.; BIGI, F.; ALITO, A.; OVERDIUM, P.; VAN SOOLINGEN, D.; ROMANO, M.I. (1999) Distribution of IS900 restriction fragment length polymorphism types among animal Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis isolates from Argentina and Europe. *Veterinary Microbiology* 70: 251-259.
53. MOREIRA, A.R.; SPATH, E.J.A.; MORSELLA, C. (1994) Seroprevalence of Johne's disease in eleven districts of Buenos Aires, Argentina. *The Paratuberculosis Newsletter* 6:18.
54. NAUTA, M.J.; VAN DER GIESSEN, (1998) Human exposure to Mycobacterium paratuberculosis via pasteurised milk: A modelling approach. *The Vet Record* 143: 293-296.
55. NIELSEN, S.S.; ENEVOLDSEN, C.; GRÖHN, Y.T. (2002) The Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis ELISA response by parity and stage of lactation. *Prev Vet Med* 54: 1-10.
56. OLSEN, I.; SIGUROARDOTTIR, O.G.; AND DJONNE, B. (2002) Paratuberculosis with special reference to cattle A review. *Veterinary Quartely* 24 (1): 12-28.
57. OLSEN, I.; REITAN, L.J.; WIKER, H.G. (2000) Distinct Differences in Repertoires of Low-Molecular-Mass Secreted Antigens of Mycobacterium avium complex and Mycobacterium tuberculosis. *J Clin Microbiol* 38: 4453-4458.
58. PAOLICCHI, F.A.; VAGNOZZI, A.; MORSELLA, C.G.; VERNA, A.E.; MASSONE, A.R.; PORTIANSKY, E.L.; GIMENO, E.J. (2001) Paratuberculosis in Red Deer (*Cervus elaphus*) an Immunohistochemical Study. *J Vet Med B* 48: 313-320.
59. PAOLICCHI, F.; Morsella, C.; Verna, A.; SPATH, E.; MARTINIS, D.; ZUMARRAGA, M.; GIOFREE, A.; CATALDI, A AND ROMANO, M (2002) Diagnosis, epidemiology, and Program of control of Paratuberculosis in bovine herds of Argentina. 7th International Colloquium on Paratuberculosis. S7. P1(114): 132.

Enfermedades sistémicas o multiorgánicas (2da parte)

Curso de Enfermedades de los rumiantes y cerdos.

Dr. Gabriel Eduardo, Travería
Dra. María Fiorella, Alvarado Pinedo.

60. PAVLIK, I.; HORVATHOVA, A.; DVORSKA, L.; SVASTOVA, P.; DU MAINE, R.; FIXA, B.; RYCHLIK, I. (1999) Homogeneity/Heterogeneity of Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis Strains: Correlation Between RFLP-Type and Source (Animal, Environment, Human). Proceedings of the Sixth International Colloquium on Paratuberculosis pp: 321-329.

Tuberculosis bovina

Introducción

La Tuberculosis (TBC) bovina es una enfermedad crónica, zoonótica, producida por el *Mycobacterium bovis*. Esta micobacteria junto con *M. tuberculosis*, *M. africanum*, *M. microtis*, cepa BCG, *M. pinnipedii* y *M. tuberculosis* subsp. *caprae*, pertenecen a lo que se denomina el Complejo Mycobacterium tuberculosis (Kleeberg, M. H. 1984.).

A pesar de que el huésped primario es el bovino, otras especies de interés económico son infectados con *M. bovis* como los porcinos, caprinos, caninos, felinos, animales silvestres y puede afectar al hombre (Carpenter, E. T. et al 1986; Kantor, I. N. et al 1974.). Los ovinos y equinos poseen una elevada resistencia natural.

Este bacilo causa en el ganado una enfermedad similar a la TBC humana conduciendo a una baja producción de leche y carne. Ningún animal que haya estado en contacto con ganado tuberculoso puede ser considerado totalmente a salvo de la enfermedad mientras viva, cualquiera sea su edad. Los animales jóvenes son más propensos a adquirirla, al igual que las hembras, siendo factores predisponentes el estrés, la preñez avanzada, el parto, alta producción lechera, etc. La frecuencia de tener signos de tuberculosis aumenta con la edad. (<http://www.senasa.gov.ar/contenido.php?to=n&in=194&io=1024>).

El hombre puede adquirir la TBC del ganado por vía aerógena, oral o cutánea. En el primer caso puede desarrollar una enfermedad pulmonar indistinguible de la producida por *M. tuberculosis*. En los otros casos, la enfermedad se manifiesta como formas extrapulmonares (digestiva, ganglionar, cutánea) (Cosivi, O. et al 1998; Grange, J. M. et al 1994). En humanos la enfermedad causada por *M. bovis* representa cerca del 0.5% de los casos con confirmación bacteriológica ocurridos en el país, llegando a alcanzar hasta un 6% en la provincia de Santa Fe (Sequeira, M. D. et al 1990). En la mayoría de estos casos, están relacionados con los grupos de riesgo, vinculados a las tareas rurales.

Más del 50% de los casos ocurridos en el país tienen asociación comprobada con actividades relacionadas con ganado, como los peones rurales, encargados de rodeos, especialmente en tareas de tambo y los empleados de frigoríficos en la playa de faena. Los veterinarios, estudiantes rurales y transportistas de ganado y leche le siguen en magnitud (Latini, O. A. 2001).

Los niveles de infección por tuberculosis bovina que presenta el rodeo nacional se estima entre un 3 y 4 %. En el Dpto. Castellanos (Santa Fe), los valores obtenidos durante 1997 alcanzaron

Enfermedades sistémicas o multiorgánicas (2da parte)

Curso de Enfermedades de los rumiantes y cerdos.

Dr. Gabriel Eduardo, Travería
Dra. María Fiorella, Alvarado Pinedo.

al 7,7 % de las vacas y al 30 % de los rodeos lecheros, presentándose de esta manera una situación sanitaria difícil. (http://rafaela.inta.gov.ar/productores97_98/p86.htm)

Características del agente etiológico.

Estas bacterias cumplen con las características generales descritas para las micobacterias en paratuberculosis. Son bacilos aerobios con una pared Gram positiva, pero que se tiñen con dificultad debido a los ácidos grasos de cadena larga (ácidos micólicos) presentes en la pared celular. Con la coloración de Ziehl Neelsen son bacilos ácido alcohol resistente (BAAR). En general son de crecimiento lento. Son moderadamente resistentes al calor, la desecación y muchos desinfectantes (Mims et al. 1999. Microbiología Médica 2da Edición).

Epidemiología

Fuente de infección:

Los bovinos infectados son la principal causa de infección. Las micobacterias pueden ser expulsadas con el aire espirado, las heces, la leche, la orina, las secreciones vaginales y uterinas y los exudados procedentes de ganglios linfáticos periféricos supurados. En los primeros estadios de la enfermedad, antes de ser visible cualquier lesión, las vacas pueden expulsar micobacterias vivas con las mucosidades nasales y traqueales.

Los animales salvajes son considerados reservorios y se deben tener en cuenta en el estudio de la epidemiología de la enfermedad.

Transmisión:

En los animales adultos la principal vía de ingreso de los gérmenes generalmente es por **inhalación** (principalmente en animales estabulados) en cambio en los terneros la **ingestión** (por contaminación con materia fecal de las pasturas y fuentes de agua de bebida) es la principal vía de ingreso.

Las micobacterias pueden sobrevivir durante mucho tiempo en las heces y el suelo, aunque en la mayoría de los estudios demostraron una sobrevida en las pasturas de semanas más que de meses esto dependerá de factores como exposición a las radiaciones ultravioletas presentes en la luz solar y la presencia de materia orgánica.

Otras vías de transmisión son la ingestión de leche infectada, vía intrauterina (a partir del semen infectado), vía intramamaria (por contaminación de pezoneras de la máquina de ordeño), raramente por contacto con gérmenes de otros animales enfermos como gatos, cabras o humanos.

Factores de riesgo:

Las explotaciones intensivas con alto hacinamiento de animales tienen mayor predisposición a sufrir la enfermedad debido al mayor contacto que tienen los animales entre sí.

Enfermedades sistémicas o multiorgánicas (2da parte)

Curso de Enfermedades de los rumiantes y cerdos.

Dr. Gabriel Eduardo, Travería
Dra. María Fiorella, Alvarado Pinedo.

Al considerar la raza, el cebú (*Bos indicus*) es mucho más resistente a la TBC que las razas europeas.

Esta bacteria es moderadamente resistente. La luz solar la destruye rápidamente, a menos que se encuentre en un medio húmedo. En condiciones favorables de calor, humedad y protección puede mantenerse viable durante semanas.

Importancia zoonótica:

El aumento de la incidencia de esta enfermedad en los humanos, principalmente en los inmunodeprimidos, ha renovado el interés por la infección con *M. bovis*, sobre todo en países en vía de desarrollo. La infección se puede presentar por consumo de leche infectada, o por inhalación.

Patogenia

La TBC se presenta en el organismo en dos estadios: el **complejo primario** y la **diseminación secundaria**. El **complejo primario** incluye la lesión en el lugar de entrada de las micobacterias y un ganglio linfático regional. Cuando la infección se produce por inhalación es frecuente una lesión en el lugar de entrada. Cuando se produce por vía digestiva no es frecuente que se encuentre una lesión en el punto de entrada, aunque se puede presentar úlceras amigdalinas o intestinales, siendo más frecuente una lesión única en los ganglios linfáticos faríngeos o mesentéricos. En los terneros se puede dar una tuberculosis meníngea con signos nerviosos.

A los 8 días de la penetración de las bacterias aparece un foco primario visible, y unas 2 semanas más tarde comienza la **calcificación** de la lesión. El foco necrótico inicial queda rodeado por un tejido de granulación, con monocitos y células plasmáticas, quedando constituido el “tubérculo” patognomónico de la enfermedad.

En los bovinos en el 90 a 95% de los casos la vía de infección es la respiratoria y desde ahí se afecta un ganglio linfático regional, siendo generalmente los lóbulos pulmonares caudales los más lesionados. En los terneros que toman leche lo más probable es que el foco primario sea en los ganglios linfáticos faríngeos o mesentéricos y que las lesiones secundarias se presenten en el hígado.

La **diseminación secundaria** a partir del complejo primario puede adoptar la forma de una tuberculosis miliar aguda (con lesiones nodulares aisladas en diferentes órganos), o de tuberculosis orgánica crónica, causada por la reinfección endógena o exógena de tejidos que se han hecho alérgicos a las proteínas de las bacterias. En este caso puede no haber lesión en los ganglios linfáticos regionales.

La toxemia causa debilidad y languidez y finalmente la muerte del animal.

Enfermedades sistémicas o multiorgánicas (2da parte)

Curso de Enfermedades de los rumiantes y cerdos.

Dr. Gabriel Eduardo, Travería

Dra. María Fiorella, Alvarado Pinedo.

Signos clínicos.

Los signos localizados son los más llamativos, aunque pueden describirse en algunos casos emaciación progresiva no asociada a otros signos, lo que debería hacer sospechar de esta enfermedad. Un apetito caprichoso y temperatura fluctuante también se puede asociar a la TBC. Si los pulmones están afectados se puede observar tos crónica debida a bronconeumonía, siendo más frecuente por la mañana y en época de frío o después de tomar agua. En casos más graves puede haber disnea, con aumento de la frecuencia y profundidad de las respiraciones. Puede presentarse una pleuritis pero suele ser asintomática ya que no se acompaña de derrame; las adenopatías mediastínicas se puede asociar a timpanismo ruminal, al principio recidivante y luego persistente.

Raras veces las úlceras tuberculosas del intestino delgado son causa de diarrea. Las adenopatías retrofaríngeas producen disfagia y respiración ruidosa debido a obstrucción faríngea.

La mastitis tuberculosa es muy peligrosa por el riesgo de zoonosis y la infección a los terneros, su signo característico es una marcada induración e hipertrofia de la base de la ubre y generalmente de los cuartos traseros. Macroscópicamente la leche al inicio es normal y luego pueden aparecer copos que decantan y dejan un líquido claro y ambarino.

En casos muy avanzados puede observarse TBC uterina, con peritonitis, salpingitis, infertilidad o abortos repetidos al final de la gestación, puede nacer un ternero que posteriormente muere por una TBC generalizada.

Diagnóstico.

La base de todos los programas de erradicación de la TBC es la prueba de la tuberculina. Esta prueba consiste en la inoculación de un antígeno, la PPD (derivado proteico purificado) en forma intradérmica a un animal, con el objeto de poder establecer si el mismo fue infectado por el agente causante de la enfermedad. Los animales reaccionan a la tuberculina a partir de las 4 a 6 semanas de producida la infección

Intradermoreacción: Esta prueba se realiza mediante la inyección de 0,1 ml de tuberculina en un pliegue de la piel de la tabla del cuello o en el pliegue anocaudal interno (en la unión mucocutánea). Se considera que la región cervical es más sensible, mientras que el pliegue anocaudal es más específico. La tuberculina se prepara a partir de cultivos de *M. tuberculosis* o *M. bovis* en medios sintéticos. La lectura se realiza a las 72 horas. La reacción positiva se reconoce por una tumefacción en el sitio de inoculación, recomendándose el uso de un calibre para realizar una mejor lectura de la reacción. La tuberculina es una prueba diagnóstica que se encuentra diseñada para ser interpretada epidemiológicamente en la población a la cual se aplica, por lo tanto no se debe interpretar en forma individual. La prueba se lee de la siguiente manera, cuando se inocula en el **pliegue anocaudal interno** se reconocen **tres**

Enfermedades sistémicas o multiorgánicas (2da parte)

Curso de Enfermedades de los rumiantes y cerdos.

Dr. Gabriel Eduardo, Travería
Dra. María Fiorella, Alvarado Pinedo.

interpretaciones: reactor positivo con una reacción \geq a **5 mm** y el rodeo se considera infectado; **reactor sospechoso** cuando la reacción se encuentra entre **3 – 5 mm** y el rodeo se considera sospechoso; el reactor sospechoso se vuelve a repetir en un lapso no menor de 60 días y no mayor a 6 meses, **si sigue dando sospechoso se considera el rodeo positivo**. Cuando la reacción es **menor de 3 mm**, el animal se considera **reactor negativo**; para considerar un rodeo negativo se debe tener no menos de 2 pruebas consecutivas negativas en todos los animales que componen el rodeo en un periodo no mayor a un año y no menor a los 60 días. Cuando la reacción se realiza **en la tabla del cuello tiene sólo dos interpretaciones**: reactor positivo mayor a 3 mm y reactor negativo menor a 3 mm.

Algunos aspectos especiales de la especificidad y sensibilidad a la tuberculina

Con respecto a la especificidad de la prueba se debe considerar que pueden observarse falsos positivos.

Falsos positivos a la tuberculina: Son animales sin lesiones macroscópicas pero positivos a la prueba cutánea; pueden aparecer en:

- ❖ Animales sensibilizados a otros alérgenos micobacterianos, incluidos los de la TBC humana o aviar, o los de paratuberculosis.
- ❖ Animales sensibilizados a otros alérgenos, como *Nocardia farcinicus* en el muermo bovino.
- ❖ Animales inyectados con irritantes en el lugar de aplicación antes de leer la prueba tuberculínica.

Con respecto a la sensibilidad:

Falsos negativos a la tuberculina: Estos casos pueden aparecer en:

- ❖ Casos avanzados de TBC.
- ❖ Animales infectados con menos de 4 - 6 semanas de infección.
- ❖ Vacas que parieron 6 semanas antes.
- ❖ Animales desensibilizados por la aplicación de tuberculina durante los 60 días previos.
- ❖ Animales viejos.
- ❖ Tuberculina de baja potencia o contaminada por bacterias.
- ❖ Dosis variable por uso de jeringas de dosis múltiples.

Desensibilización: Se da cuando un animal reactor da resultados negativos a la prueba. La **desensibilización** puede ser causada por la absorción local de tuberculina y de otras proteínas extrañas; en estos casos se recomienda repetir la prueba 60 días después de la aplicación.

Hay que tener en cuenta que inmediatamente antes y después del parto las vacas tuberculosas sufren un periodo de desensibilización, dando aproximadamente un 30% de reacciones falsamente negativas; la positividad se alcanza nuevamente 4 – 6 semanas después.

Enfermedades sistémicas o multiorgánicas (2da parte)

Curso de Enfermedades de los rumiantes y cerdos.

Dr. Gabriel Eduardo, Travería

Dra. María Fiorella, Alvarado Pinedo.

Anergia: Se consideran anérgicos aquellos animales con lesiones visibles de TBC pero que no reaccionan a una prueba cutánea.

Diagnóstico diferencial:

Debido a la naturaleza crónica de la enfermedad y a la multiplicidad de los signos clínicos por la variada localización de las lesiones es de difícil diagnóstico clínico. Las enfermedades a considerar son numerosas: absceso pulmonar debido a neumonía por aspiración; retículo peritonitis traumática, enfermedad de las vías respiratorias superiores, actinobacilosis, leucosis bovina, adenopatías, otras causas de mastitis, paratuberculosis, hepatitis crónicas, parasitosis, etc.

(Radostits OM, Gay CC, Blood DC, Hinchcliff KW. Medicina Veterinaria. 9na edición. Editorial Mc Graw-Hill- Interamericana. 2002)

Medidas de prevención y/o control

En la Argentina SENASA está implementando el **Programa nacional de control y erradicación de la tuberculosis bovina.**

http://www.senasa.gob.ar/normativas/resolucion-128-2012-senasa-servicio-nacional-de-sanidad-y-calidad-agroalimentaria?_ga=2.36020512.1222099439.1558796282-1205852974.1550512508

Las medidas de prevención y control que se sugieren incluyen:

1. Detectar a los animales enfermos mediante la tuberculinización de todo bovino mayor de tres (3) meses de edad.
2. Eliminar inmediatamente con destino a faena los reaccionantes positivos.
3. No repetir la tuberculinización a un reactor positivo “debe eliminarse”.
4. Higienizar (lavado y cepillado) y desinfectar (fenol al 5%) las instalaciones.
5. Comprar animales en establecimientos oficialmente libres.
6. Separar las crías de las vacas positivas, suministrar calostro de vacas negativas y posteriormente alimentar con sustituto lácteo o leche en polvo.
7. Controlar la introducción de animales al rodeo mediante la cuarentena (aislamiento) realizando en ella una prueba tuberculínica.
8. Separar en los establecimientos en saneamiento las distintas categorías de animales, separando las vaquillonas de las vacas viejas.
9. Evitar el uso común de bebederos y comederos por animales enfermos y sanos.

No existe vacuna contra la tuberculosis bovina en los animales.

Enfermedades sistémicas o multiorgánicas (2da parte)

Curso de Enfermedades de los rumiantes y cerdos.

Dr. Gabriel Eduardo, Travería
Dra. María Fiorella, Alvarado Pinedo.

Virus de la Diarrea Viral Bovina – Enfermedad de las Mucosas

Introducción.

La Diarrea Viral Bovina – Enfermedad de las Mucosas (DVB – EM) es una de las enfermedades infecciosas virales más comunes en el ganado bovino y su distribución es mundial, siendo endémica en la mayoría de las poblaciones bovinas. Ambas presentaciones se describieron por primera vez en 1946 como dos entidades diferentes, siendo recién hacia 1960 confirmada la etiología viral común. Se observó que la EM sólo aparecía en los animales persistentemente infectados (PI) producida por una cepa no citopática adquirida en la vida fetal temprana; en estos animales ocurre una mutación que transforma a la cepa no citopática en citopática entre los 6 y 24 meses de edad. (Blood, D 1992).

Características del agente etiológico

El virus de la diarrea viral bovina (vDVB), agente causal de la DVB, es miembro del género *Pestivirus*, perteneciente a la familia *Flaviviridae*. (Donis, 1995; Vanroose et al, 1998; Njaa et al, 2000). El vDVB es relacionado antigénicamente con el virus del cólera porcino (VCP) y el virus de la enfermedad de la frontera o enfermedad de Border que afecta al porcino y ovino respectivamente (Paton, 1995; Murphy et al, 1995; Vega et al, 2000).

Los *Pestivirus* infectan naturalmente sólo a los ungulados del Orden *Artiodactyla*. (*Artiodactyla*, del griego artios, “par” y dáktylos, “dedo”, mamíferos ungulados cuyas extremidades terminan en un número par de dedos de los cuales apoyan en el suelo por lo menos dos, que son simétricos).

Los *Pestivirus* rumiantes infectan a porcinos, bovinos, ovinos, caprinos, alpacas, llamas, camellos, búfalos de agua y rumiantes silvestres (Nettleton PF, Entrican G. 1995).

La principal característica de este virus es su variabilidad genética y antigénica. Los virus ARN carecen de una exonucleasa eficiente para corregir las bases mal incorporadas. El vDVB usa esta estrategia para sobrevivir, originando cepas mutantes que escapan a la respuesta inmunológica del hospedador. El cruce de especies crea otra oportunidad para la diversificación, ya sea por adaptación al nuevo hospedador o por evolución divergente. Sin embargo, el vDVB aislado de cerdos y ovejas tiene características biológicas y antigénicas similares a los aislados del bovino. En 1992 Bolin y Ridpath demostraron que nuevas variantes antigénicas se originan durante el pasaje del virus en bovinos susceptibles que desarrollan una infección aguda. Esto sugiere que, mientras los animales persistentemente infectados son más importantes como

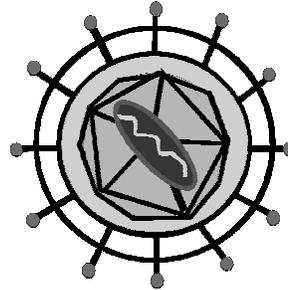
Enfermedades sistémicas o multiorgánicas (2da parte)

Curso de Enfermedades de los rumiantes y cerdos.

Dr. Gabriel Eduardo, Travería
Dra. María Fiorella, Alvarado Pinedo.

reservorios, los animales con infección aguda pueden ser más importantes para la generación de nuevas variantes antigénicas.

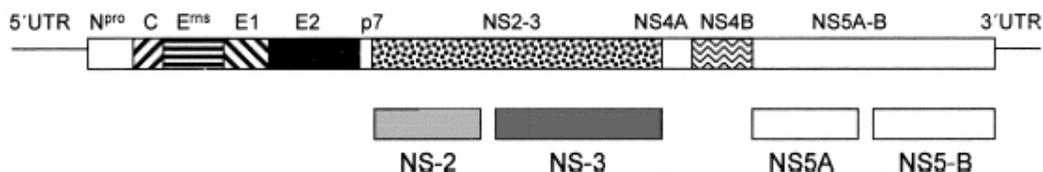
Morfología: El vDVB mide entre 40 - 60 nm de diámetro, está constituido por una cápside icosaédrica de 25 a 37 nm de diámetro, de naturaleza proteica y una envoltura externa. (Kobrak y Weber, 1997; San Juan et al, 1999).



Genoma y proteínas: La información genética del vDVB, está contenida en una molécula de ARN de simple cadena de polaridad positiva, el genoma está constituido de 12.0 a 12.5 kilobases (Paton, 1995; Potgieter, 1995; Neill y Ridpath, 2001). El primer evento de la biosíntesis del virus es la traducción del código genético en una poliproteína que es cortada durante y post traduccionalmente para dar lugar a las diferentes proteínas estructurales y no estructurales del virus (Neill y Ridpath, 2001).

Estas proteínas están ubicadas desde el extremo NH₂ (Nterminal) hacia el extremo COOH (C-terminal) de la poliproteína, como sigue: NH₂ - Npro (proteasa) - C (proteína de la nucleocápside) - Erns (ARNasa) - E1 - E2 (proteínas de la envoltura) - p7 (posible viroporina, (Elbers et al., 1996; Harada et al., 2000)) - NS2 - NS3 - NS4A - NS4B - NS5A - NS5B (Proteínas no estructurales) - COOH (Bolin, 2002; Collett et al., 1988; Collett et al., 1991; Elbers et al., 1996).

La siguiente figura esquematiza la organización genómica de vDVB: el genoma de vDVB consiste en una cadena simple de ARN de polaridad positiva, el esquema muestra las localizaciones de los sitios de clivaje y los productos maduros de la poliproteína viral. Las **proteínas de la envoltura** son **Erns, E1 y E2** y las **proteínas no estructurales** son **NS2-3** (que luego se cliva y forma NS2 y NS3 en los biotipos cp), **NS4A, NS4B y NS5A-B** (después del clivaje forma NS5A y S5B) (Bolin, 2002).



La **glicoproteína E2** está expuesta sobre la cara externa del virus (Weiland et al., 1999) y media su entrada a las células blanco. E2 es la principal inductora de anticuerpos neutralizantes en el huésped luego de la infección o de la vacunación (Bolin, 1993; Paton et al., 1992; Xue et al.,

Enfermedades sistémicas o multiorgánicas (2da parte)

Curso de Enfermedades de los rumiantes y cerdos.

Dr. Gabriel Eduardo, Travería

Dra. María Fiorella, Alvarado Pinedo.

1990). Contiene una región hipervariable y altamente mutable. Es el sitio donde ocurren las mutaciones y cambios antigénicos que dan lugar a la aparición de cepas variantes del vDVB (Paton, 1995; Donis, 1995; Van Oirschot et al, 1998; Bruschke et al, 1997).

La proteína no estructural **NS2-3** es producida por vDVB citopático y no citopático. La mayoría de los clivajes son catalizados por un dominio serin-proteasa dentro de NS3 y genera las proteínas no estructurales desde NS3 hasta NS5B. Luego de que la proteína NS2-3 del vDVB citopático se cliva, se forman las proteínas NS2 y NS3.

La expresión de la proteína **NS3 (p80)** se considera un marcador molecular para **vDVB citopático**. La forma no clivada de NS2-3 solo puede ser detectada en los vDVB no citopático. (Meyers et al., 1996; Peterhans et al., 2010).

Biotipos: El vDVB, presenta dos biotipos diferenciados por sus efectos en cultivo celular: biotipo citopatogénico (CP) y biotipo no citopatogénico (NCP) (Vanroose et al, 1998; Paton, 1995), el biotipo citopatogénico, causa vacuolización y muerte celular *in vitro*.

El biotipo citopatogénico surge a partir del biotipo no citopatogénico del vDVB, esta diferenciación se da por el procesamiento de la **proteína NS2-3** o p125 presente en el biotipo NCP; el biotipo CP posee además de la proteína p125, la **proteína p80**, la cual le confiere el fenotipo citopatogénico al virus.

El origen del virus CP, a partir del virus NCP del vDVB, explica el gran nivel de similitud antigénica encontrado entre estos dos biotipos del vDVB (CP/NCP); además, del origen espontáneo de la enfermedad de las mucosas ante la presencia de ambos biotipos en el mismo animal (Paton, 1995). El biotipo NCP del vDVB, es aislado comúnmente de animales con infección aguda y están presentes invariablemente en animales persistentemente infectados (PI) (Paton, 1995).

Genotipos y cuasiespecies en *Pestivirus*: A través de estudios de secuenciamiento genético el vDVB ha sido subdividido en dos genotipos, el tipo I y II (Pellerin et al, 1994; Ridpath et al, 2000).

- El genotipo I incluye las cepas de campo, de laboratorio y las vacunales.
- El genotipo II está compuesto por las nuevas cepas asociadas con una alta mortalidad, trombocitopenia y hemorragias en USA y Canadá (Ridpath et al, 2000).

Ambos genotipos fueron aislados en la Argentina.

Realizando estudios de similitudes globales el genotipo I posee más de 20 subgrupos siendo los más comunes el 1a, 1b, 1c y 1d (Pellerin et al, 1994; Harasawa, Sasaki, 1995; Baule et al 1997). En la Argentina se encontraron estos subgrupos y además se logró aislar un subgrupo propio

Enfermedades sistémicas o multiorgánicas (2da parte)

Curso de Enfermedades de los rumiantes y cerdos.

Dr. Gabriel Eduardo, Travería

Dra. María Fiorella, Alvarado Pinedo.

llamado 1Arg. (Jones et al, 2001). Analizando la aparición de los subgrupos y la presencia de los diferentes síntomas se observó que algunos subgrupos surgieron en conjunto con un cambio de sintomatología. El síntoma “ancestral” sería “Problemas Entéricos”. La emergencia de los genotipos 1b y 1d se correspondería con un cambio de la patogénesis hacia “Problemas Respiratorios”. En el caso del subgrupo 1 Arg el cambio sería hacia “Problemas Reproductivos”. Además debemos recordar que en virus ARN las infecciones se presentan en forma de conjunto de variantes genéticas. A este conjunto de mutantes simples y múltiples que coexisten en un individuo (o cultivo celular) infectado se lo denomina cuasiespecie. Las características y frecuencias de cada variante constituyen el “espectro de mutantes” del virus. Cuanto más complejo es el espectro de mutantes, mayor será la capacidad adaptativa del virus (Jones, LR 2002). Estos conceptos son muy importantes a tener en cuenta en el momento de diseñar estrategias de control de la enfermedad en bovinos y para el estudio de la patogenia y evolución de estos virus.

Replicación viral.

El vDVB, presenta un especial tropismo por células mitóticamente activas como: linfocitos, fagocitos mononucleares y células epiteliales (Njaa et al, 2000; Polak y Zmudzinski, 1999; Potgieter, 1995). La replicación comienza con la adhesión y penetración en la célula hospedadora por medio de un receptor específico, el virus ingresa al citoplasma mediante endocitosis mediada y libera su genoma en el citosol, y luego el ARN viral es traducido en el ribosoma en una poliproteína, la misma es cortada por enzimas de origen viral en polipéptidos que constituyen las proteínas estructurales y no estructurales, y el ensamblaje tiene lugar tanto en el aparato de Golgi como en el retículo endoplásmico donde los viriones adquieren su envoltura lipídica. Cada célula infectada libera de 100 a 1000 viriones que alcanzan el medio extracelular mediante exocitosis. (Xue et al, 1997; San Juan, 1999).

Epidemiología.

El vDVB tiene una distribución mundial y es responsable de un síndrome que va desde signos muy benignos a severos, e incluyen la potenciación de otras infecciones, fallas reproductivas (Polak y Zmudzinski, 1999), defectos congénitos, animales PI, infecciones agudas, y una generalmente fatal enfermedad de las mucosas (Njaa et al, 2000; Paton, 1995; Baker, 1987).

En la mayoría de los países alcanza niveles de 60 a 80% de bovinos seropositivos y un 0,5 a 2% de bovinos PI

En la Argentina los datos de seroprevalencia son variables. En 1997 Kobrak y Weber confirman que la situación en Argentina es similar al resto del mundo, con 70% de seroprevalencia y un 1 % de bovinos PI. Odeón y col. (2000) observan seroprevalencias del 90,7% y 48,6% en bovinos

Enfermedades sistémicas o multiorgánicas (2da parte)

Curso de Enfermedades de los rumiantes y cerdos.

Dr. Gabriel Eduardo, Travería

Dra. María Fiorella, Alvarado Pinedo.

adultos en el sudeste de la provincia de Buenos Aires y en los llanos de La Rioja, respectivamente. Estos números indican la presencia de la enfermedad en forma endémica en algunas regiones. La seroprevalencia de fetos bovinos es de 22% (Muños y col, 1996).

Fuente de la infección: Los animales PI, juegan un rol importante como la fuente principal de diseminación del VDVB, y por ende de la infección (Njaa et al, 2000; Polak y Zmudzinski, 1999). Los animales PI eliminan grandes cantidades de virus durante toda su vida a través de secreciones y excreciones tales como descarga nasal, saliva, semen, orina, heces, lágrimas y leche (Brock et al, 1991; Houe, 1995; Sandvik, 1999).

Los animales con infección aguda, representan también una fuente importante de diseminación viral durante la infección, el virus es usualmente excretado a partir del día 4 al día 10; aunque el virus puede ser excretado durante un periodo mayor (Brownlie et al, 1991). Si bien, los animales con infección aguda también eliminan virus por secreciones y excreciones, la cantidad del virus es mucho menor en relación a los animales PI. (Houe, 1995; Kirkland et al, 1992).

Hay que tener en cuenta que el virus también ha sido aislado en pequeños rumiantes y algunos de vida silvestre o en cautiverio; siendo estas especies, consideradas fuente potencial de transmisión del virus (Houe, 1995).

Transmisión

La transmisión puede ser vertical y horizontal; siendo la transmisión vertical la que se da de una generación a la siguiente, pudiéndose esta aplicarse para los animales PI. Sin embargo, en muchos casos, la transmisión vertical es precedida por una transmisión horizontal a la madre, y durante esta infección aguda de la madre atraviesa la placenta e infecta al feto (Houe, 1995).

Transmisión vertical: La transmisión vertical ocurre de una generación a otra. Se incluye la transmisión al feto a través del semen infectado de toros con infección aguda o PI. Las hembras seronegativas pueden ser inseminadas con semen infectado pudiendo infectarse, sin embargo, la producción de fetos PI raramente ocurre por esta ruta; en caso de ocurrir la producción de una cría PI, entonces es una transmisión vertical, aunque como ya se mencionó va precedida de una transmisión horizontal.

A pesar de la alta mortalidad entre los terneros PI (Houe, 1993), algunos pueden llegar a adultos y reproducirse, entonces los terneros de madres PI son también PI, por lo tanto, se forman líneas familiares de animales PI y puede ocurrir en varias generaciones (Houe, 1991). Además, puede ocurrir transmisión vertical después de la transferencia de embriones, si la receptora es PI, si la hembra donante es PI. El vDVB está presente en niveles altos en el medio uterino, por ello antes

Enfermedades sistémicas o multiorgánicas (2da parte)

Curso de Enfermedades de los rumiantes y cerdos.

Dr. Gabriel Eduardo, Travería
Dra. María Fiorella, Alvarado Pinedo.

se puede dar una transmisión horizontal de madre a madre a través de los procedimientos del lavado (Houe, 1995).

Transmisión horizontal: La transmisión horizontal puede ser directa o indirecta. La transmisión directa, ocurre por contacto entre animales susceptibles y animales PI, siendo esta la vía más importante de transmisión de la infección; presumiblemente, la más eficiente es el contacto de nariz a nariz (Travén et al, 1991).

Al igual que en la transmisión vertical, la principal fuente de infección son los animales PI, aunque también está probado la capacidad de transmitir el vDVB a partir de animales con infección aguda.

El semen es una fuente importante de transmisión horizontal para las vacas, esto está asociado con la eliminación del virus a través de este medio.

Experimentalmente se han demostrado varias vías de transmisión indirecta, por ejemplo por el uso de agujas, mocheta, palpación rectal y la acción de insectos hematófagos, minutos después de haber estado en contacto con animales PI. Sin embargo, su importancia práctica aún no es clara, ya que es un virus que se inactiva fácilmente. Es rápidamente inactivado por el calor, desecación, luz ultravioleta, detergentes, solventes orgánicos y pH que exceda el rango de 5,7 a 9,3 (Tremblay R. 1996).

Patogénesis

La transmisión horizontal del virus es en forma directa, por inhalación de saliva infectada, descarga oculo nasal, vaginal, orina, heces. La transmisión, también puede ocurrir a través de semen de toros infectados en forma aguda o toros PI (Vanroose et al, 1998; Baker, 1995). La transmisión vertical ocurre en cualquier etapa de la gestación; además la transmisión también es posible vía agujas hipodérmicas (Baker, 1987; Bitsch y Ronsholt, 1995).

Las primeras poblaciones celulares que soportan la replicación viral son las células epiteliales de la cavidad bucal, tonsilas y del tracto digestivo, células linfoides, como consecuencia el animal puede presentar múltiples expresiones clínicas.

Manifestaciones clínicas

El vDVB es responsable de originar un amplio rango de manifestaciones clínicas y lesiones como resultado de la interacción de factores tales como: cepa y biotipo viral, edad y estado inmune del hospedador, respuesta inmune inducida, factores estresantes y otros patógenos concurrentes (Bielefeldt Ohmann H.1995). Se pueden describir las siguientes presentaciones:

a) Diarrea viral bovina de presentación subclínica. El 70 a 90% del ganado adulto susceptible cursa la DVB subclínica. El periodo de incubación es de 5 a 7 días

Enfermedades sistémicas o multiorgánicas (2da parte)

Curso de Enfermedades de los rumiantes y cerdos.

Dr. Gabriel Eduardo, Travería
Dra. María Fiorella, Alvarado Pinedo.

aproximadamente luego de lo cual se presenta una ligera fiebre y leucopenia transitoria, que usualmente no es notado por el veterinario o productor siendo esto seguido por una producción de anticuerpos neutralizantes (Baker, 1987). En general es raro que el vDVB cause enfermedad en animales inmunocompetentes; sin embargo, debido a su rol inmunosupresor el vDVB puede potenciar o favorecer el desarrollo de infecciones secundarias (Obando, 1999).

b) Inmunodepresión. El vDVB ocasiona leucopenia y altera las funciones de los leucocitos, aumentando la patogenicidad de microorganismos coinfectantes. Tiene una fuerte afinidad por el tejido linforreticular, ocasionando necrosis y atrofia de dichos tejidos (Baker JC. 1987). En el tejido linfoide el virus se localiza principalmente en las células parenquimales y del estroma, incluyendo macrófagos y células de soporte. Estas células elaboran citoquinas esenciales para el normal desarrollo y maduración de linfocitos, lo que sugiere que la necrosis linfoide es secundaria al trastorno del microambiente que proveen las células intersticiales y no a la acción directa del virus sobre los linfocitos (Brodersen BW, Kelling CL. 1998).

c) Infección aguda severa. Generalmente las infecciones agudas cursaban con baja mortalidad. Sin embargo, cada vez son más frecuentes los informes de infección aguda severa de elevada morbilidad y mortalidad, asociada con virus de alta patogenicidad, caracterizada por fiebre elevada, signos respiratorios, diarrea, tormenta de abortos, caída en la producción de leche y muerte súbita (Drake TR y col 1996 ; Sockett D y col 1996). En otros casos, la exposición a cepas de alta virulencia ocasiona una enfermedad con signos clínicos y lesiones anatomopatológicas similares a la forma de enfermedad de las mucosas (David GP y col 1994; Hibberd RC y col 1993; Tremblay R y col 1996).

d) Síndrome hemorrágico. En USA y Canadá, se han publicado casos en donde se observaron animales con diarrea sanguinolenta, epistaxis, congestión en conjuntiva y mucosas, hemorragias petequiales y equimóticas en mucosas, los animales mostraron pirexia, leucopenia, trombocitopenia, linfopenia y neutropenia. Este síndrome ha sido asociado con infecciones por cepas NCP del genotipo II (Ridpath et al, 2000).

Esta signología se atribuye a trombocitopenia y alteración de la función plaquetaria. Se ha demostrado una disminución de la respuesta de las plaquetas a la agregación y, aunque se desconoce el mecanismo de estas alteraciones, es probable que el virus actúe por uno o más de estos mecanismos: 1) se ha detectado antígeno viral en los megacariocitos, lo que podría resultar en una menor producción de plaquetas y en un incremento en el porcentaje de plaquetas envejecidas (los trombocitos viejos son menos sensibles a los estímulos de agregación); 2) el virus se aísla de trombocitos y una interacción virus–plaqueta directa puede afectar la respuesta plaquetaria a la agregación; 3) aumento en la producción de sustancias inhibitoras de la agregación plaquetaria; bovinos infectados con el vDVB presentan altas concentraciones de prostaglandina E y óxido nítrico (Walz PH, Steficek BA, Baker JC. 1999). Hay una fuerte

Enfermedades sistémicas o multiorgánicas (2da parte)

Curso de Enfermedades de los rumiantes y cerdos.

Dr. Gabriel Eduardo, Travería

Dra. María Fiorella, Alvarado Pinedo.

correlación entre la fase trombocitopénica y la viremia; además, la recuperación del recuento plaquetario está estrechamente relacionada con la aparición de anticuerpos neutralizantes. Esto sugiere que este síndrome es el resultado de una alteración y consumo de los trombocitos periféricos, más que una alteración en su producción (Hamers C, Couvreur B, Dehan P, Letellier C, Lewalle P, Pastoret P, Kerkhofs P. 2000).

d) Enfermedad de las mucosas (EM). La EM es usualmente de curso fatal y está asociado con superinfección del animal PI con el biotipo NCP, por el biotipo CP del vDVB (Brownlie et al, 1998; Bolin et al, 1990; Paton, 1995), teniendo como condición, que el biotipo superinfectante CP debe ser antigénicamente homólogo al biotipo NCP presente en el animal. (Vanroose et al, 1998; Paton 1995). Estos animales desarrollan diarrea profusa, una rápida pérdida de condición corporal, erosiones a nivel del tracto gastrointestinal, y muerte (Tautz et al, 1994; Bolin et al, 1995a).

e) Trastornos reproductivos. El mayor impacto económico de la infección con el vDVB es el ocasionado por los trastornos reproductivos.

Los toros infectados en forma aguda o PI, producen semen infectado con el vDVB, como consecuencia de la replicación del virus en la vesícula seminal y glándula prostática (Kirkland et al, 1997), el cual sirve como medio para la transmisión del virus a vacas susceptibles.

La calidad del semen infectado por el vDVB, es caracterizado por el decrecimiento de la motilidad, incremento del porcentaje de anomalías morfológicas de las células espermáticas. (Kirkland et al, 1994; Baker, 1987).

En la hembra no gestante la infección aguda altera la función ovárica y reduce la fertilidad. El vDVB causa ooforitis intersticial no purulenta, con necrosis de células de la granulosa y de oocitos (McGowan MR y col 2003; Ssentongo y col 1980). Además, las infecciones agudas ocasionan un retraso en el desarrollo de los folículos pre-ovulatorios durante dos ciclos estrales consecutivos (Grooms DL, Brock KV, Pate JL, Day ML. 1998), reducción de los niveles de estradiol durante la fase folicular (Fray MD, Mann GE, Clarke MC, Charleston B. 1999) y disminución o ausencia de las oleadas de hormona luteinizante pre-ovulatoria o retraso en el tiempo del pico de hormona luteinizante pre-ovulatoria (McGowan MR y col 2003).

No está claro de qué manera el vDVB altera la función ovárica, aunque es posible que actúe por uno o más de los siguientes mecanismos: 1) inadecuado soporte gonadotrófico por infección de la glándula pituitaria (Fray MD, Paton DJ, Alenius S. 2000); 2) la leucopenia que acompaña a la infección aguda puede ser el reflejo de una deficiencia en la población de leucocitos ováricos, células vitales para la dinámica folicular normal (Fray MD, Paton DJ, Alenius S. 2000); 3) la necrosis de las células de la granulosa de los folículos pre-ovulatorios, afecta negativamente la secreción de estradiol y, consecuentemente, suprime la liberación de hormona luteinizante y retrasa o impide la ovulación (McGowan MR y col 2003); 4) la disfunción ovárica puede ser el

Enfermedades sistémicas o multiorgánicas (2da parte)

Curso de Enfermedades de los rumiantes y cerdos.

Dr. Gabriel Eduardo, Travería
Dra. María Fiorella, Alvarado Pinedo.

resultado de la ooforitis y de los cambios en la concentración de citoquinas ováricas (Grooms DL, Brock KV, Pate JL, Day ML. 1998); 5) la reducción de los niveles de estradiol durante la fase folicular pueden perjudicar el comportamiento estral, impedir la ovulación o reducir el número y calidad de oocitos liberados (Fray MD, Mann GE, Clarke MC, Charleston B. 1999).

En la hembra gestante la infección con vDVB tendrá diferentes consecuencias según el momento de la gestación; por lo tanto se pueden describir cuatro etapas:

Etapla embrionaria (0–45 días): Estas infecciones de hembras ocasionan muerte embrionaria y repeticiones de servicio (Grahm TC y col 1984; McGowan MR y col 2003; Virakula P y col 1988). Se desconoce cómo los biotipos NCP afectan al embrión. El virus tiene efecto sobre los embriones desde el día 8–9, momento en que pierden la zona pelúcida y se vuelven susceptibles. El resultado de la infección puede ser citolítico o no. Ambos terminan en muerte embrionaria, aunque la infección no citolítica también puede causar daño cromosómico, resultando en el desarrollo de malformaciones.

Día 45 a 125 de gestación: Este período comienza al finalizar la etapa embrionaria y culmina cuando el feto adquiere competencia inmunológica al vDVB. La infección con biotipos NCP en esta etapa resulta en el nacimiento de animales persistentemente infectados e inmunotolerantes. Durante este período también se produce muerte fetal con momificación o aborto meses después y un pequeño porcentaje de teratogénesis (Dubovi EJ. 1994; Moennig V, Liess B. 1995).

Persistentemente infectados:

Los pestivirus son considerados como uno de los agentes virales más exitosos de la naturaleza por su habilidad de difundirse, causar enfermedad y aun persistir dentro de una población sin ser descubierto. En este sentido el virus es mantenido en la naturaleza principalmente a través de animales PI. La inmunotolerancia que presentan es a la cepa viral específica, es decir, estos animales no desarrollan anticuerpos neutralizantes contra el vDVB presente en el animal, sin embargo, son inmunocompetentes a otras cepas diferentes del vDVB u otros agentes infecciosos. En estos animales el virus persiste en todos los tejidos, especialmente en las células del sistema inmune y tejidos inmunológicamente privilegiados como el sistema nervioso central (Sandvick, 1999).

El animal PI es considerado el reservorio o portador más importante del VDVB ya que elimina continuamente grandes cantidades del virus en sus secreciones y excreciones y son incapaces de responder formando anticuerpos o inmunidad mediada por células, por ser animales inmunotolerantes y probablemente también por el continuo daño funcional de las células del sistema inmune.

Día 125 a 175 de gestación: Este período representa el comienzo de la inmunocompetencia fetal y del estado de organogénesis, momento en el cual se presenta un gran porcentaje de alteraciones del desarrollo. También se pueden producir abortos, pero éstos son más frecuentes

Enfermedades sistémicas o multiorgánicas (2da parte)

Curso de Enfermedades de los rumiantes y cerdos.

Dr. Gabriel Eduardo, Travería
Dra. María Fiorella, Alvarado Pinedo.

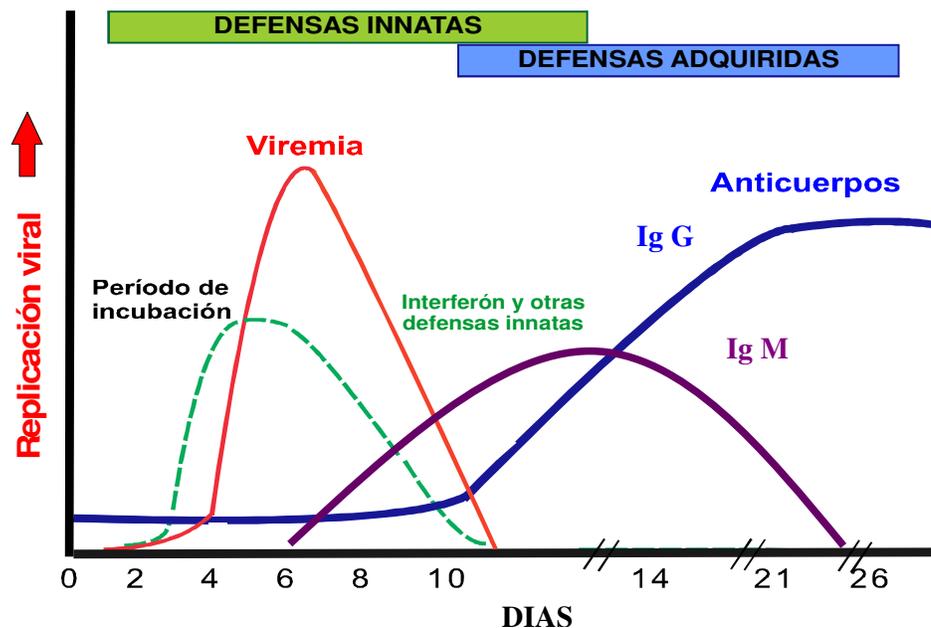
en las etapas tempranas de gestación. Se pueden observar distintos tipos y grados de malformaciones tales como hipoplasia cerebelar, microencefalia, hipomielogénesis, hidranencefalia, hidrocefalia, atrofia o hipoplasia de timo, cataratas, microftalmia, degeneración de retina, hipoplasia y neuritis del nervio óptico, alopecías, hipotricosis, hipoplasia pulmonar, braquignatismo, artrogriposis, retraso general del crecimiento y deformidades esqueléticas. Posibles explicaciones de estas malformaciones serían el daño celular directo por el virus o la destrucción de las células infectadas por el sistema inmune fetal.

La inmunohistoquímica reveló abundante cantidad de antígeno en glándula pituitaria, hipotálamo y tiroides de un ternero infectado in útero con trastornos severos y generalizados de la osteogénesis. Este hallazgo sugiere que el virus altera el metabolismo hormonal fetal originando trastornos del desarrollo esquelético (Constable PD, Hull BL, Wicks JR, Myer W. 1993).

175 días de gestación en adelante: En esta etapa el feto se encuentra en un período de crecimiento general y es inmunológicamente competente. Las infecciones en este período resultan en el nacimiento de terneros seropositivos normales o débiles; mientras que los abortos son ocasionales (Dubovi EJ. 1994; Moennig V, Liess B. 1995).

Respuesta inmune

Secuencialmente se produce una respuesta inmune innata y posteriormente una respuesta inmune adaptativa.



La respuesta innata se lleva a cabo principalmente a partir de la producción de Interferon de tipo I (α y β) y del reconocimiento de células infectadas por las células naturalmente asesinas (NK).

Enfermedades sistémicas o multiorgánicas (2da parte)

Curso de Enfermedades de los rumiantes y cerdos.

Dr. Gabriel Eduardo, Travería
Dra. María Fiorella, Alvarado Pinedo.

La respuesta adaptativa es realizada por células linfáticas, principalmente LT citotóxicos y LB productores de anticuerpos neutralizantes.

En DVB la respuesta inmune es dirigida contra todas las proteínas estructurales y no estructurales del virus (Donis et al, 1995). El vDVB induce respuesta de células B como de células T (Larsson y Fossum, 1992). Las células CD4+, pueden proporcionar ayuda para la producción de anticuerpos neutralizantes capaces de limitar la diseminación del virus (Rhodes et al, 1999).

La persistencia del vDVB en el ganado es una consecuencia específica de la inmunotolerancia de los linfocitos B y linfocitos T frente al antígeno del vDVB (Larsson y Fossum, 1992). Los anticuerpos neutralizantes y no neutralizantes contra el vDVB están ausentes en esos animales PI; pero estos animales son inmunocompetentes a otros antígenos incluso a otras cepas del vDVB.

Diagnóstico

La realización de una anamnesis detallada correlacionada con los signos clínicos, hallazgos macroscópicos y microscópicos son fundamentales para el diagnóstico. Sin embargo, no existen signos clínicos patognomónicos en una infección con el vDVB. Por lo tanto, la confirmación que puede brindarnos el laboratorio es esencial mediante el aislamiento del virus, detección de antígenos virales o detección de ácido nucleico y detección de anticuerpos contra el virus.

Los animales PI pueden ser identificados por el uso combinado de pruebas serológicas y pruebas de identificación viral o en muestras de sangre.

Aislamiento viral en cultivo celular: Es la prueba de oro y tiene alta especificidad, pero es costoso, muy laborioso, requiere muchos días obtener el resultado y es dependiente de cultivo de células. El aislamiento viral puede realizarse a través de muestra de secreciones y tejidos fetales o sangre entera (Sandvik, 1999).

Detección de antígenos virales.

a) Inmunofluorescencia Directa: Es una prueba inmunohistoquímica rápida para detectar antígeno viral en muestras de tejido fresco mediante el uso de anticuerpos monoclonales o policlonales contra el vDVB marcados con fluorocromos.

b) Inmunoperoxidasa: Es una prueba inmunohistoquímica rápida para detectar antígenos virales en muestras de tejido fresco o fijado en formalina. Esta prueba es similar a la IF, pero en este caso el anticuerpo monoclonal o policlonal está marcado a una enzima como la peroxidasa. Esta técnica no requiere de microscopio de fluorescencia.

Enfermedades sistémicas o multiorgánicas (2da parte)

Curso de Enfermedades de los rumiantes y cerdos.

Dr. Gabriel Eduardo, Travería
Dra. María Fiorella, Alvarado Pinedo.

c) ELISA de captura de antígenos: El ELISA de captura de antígenos se basa en la detección de antígenos a través de anticuerpos monoclonales (Mabs). Debido a que los Mabs utilizados reconocen la p125, debe ser capaz de detectar muchas si no todas, las cepas del vDVB. La rapidez y su independencia de cultivos celulares han hecho de esta prueba una herramienta muy útil para el examen de grandes cantidades de muestras en programas de control.

La prueba utiliza dos grupos de anticuerpos monoclonales, los cuales reconocen diferentes epítopes conservados en el polipéptido no estructural 125K/80K del virus, uno de ellos está pegado a los hoyos de la microplaca, los cuales capturan al antígeno viral de las muestras, el antígeno capturado es detectado por el otro Mabs conjugado con una peroxidasa. La presencia de color seguida de la adición del sustrato de la enzima identifica muestras positivas (Sandvik, 1999).

Detección de anticuerpos

Las pruebas de inmunoabsorbancia ligada a enzimas ELISA y virus neutralización, son las más comúnmente usadas para la detección de anticuerpos contra el vDVB (Edwards, 1990; Paton et al, 1991; Kramps et al, 1999).

a) Virus neutralización: Es la prueba serológica de oro, es altamente específica para detectar el vDVB, aceptada mundialmente como referencial para anticuerpos contra el vDVB (Edwards, 1990); sin embargo, existen varias condiciones que pueden afectar el resultado de la prueba: el biotipo del virus, línea celular, y medio para el cultivo celular; además de la performance de la prueba (Fredriksen et al, 1999; Edwards, 1990; Brock, 1995).

El fundamento de la prueba radica en la capacidad de los anticuerpos para neutralizar la citopatogenicidad o la capacidad del virus de infectar a las células in vivo o in vitro (Rivera et al, 1993). Esta técnica es cualitativa y permite detectar y titular anticuerpos.

b) Inmunoabsorbancia ligada a enzimas (ELISA): Los ELISAs pueden ser indirecta o de competición o de bloqueo utilizadas como pruebas tamiz en estudios epidemiológicos y en los programas de erradicación de enfermedades en grandes poblaciones. (Kramps et al, 1999). Estas pruebas son muy utilizadas debido a su independencia de cultivos celulares, pueden ser aplicados en muestras de leche, plasma y suero, es factible tener el resultado en pocas horas, y es posible su automatización (Niskanen et al, 1989; Sandvik, 1999)

Detección del ácido nucleico viral:

Los avances que se han producido en biología molecular, han contribuido al desarrollo de nuevas técnicas de diagnóstico altamente sensibles. Técnicas de DNA recombinante se aplican

Enfermedades sistémicas o multiorgánicas (2da parte)

Curso de Enfermedades de los rumiantes y cerdos.

Dr. Gabriel Eduardo, Travería

Dra. María Fiorella, Alvarado Pinedo.

para la detección rápida de ácidos nucleicos víricos. La reacción en cadena por la polimerasa (PCR), es altamente sensible al virus de la diarrea viral bovina (vDVB) (Njaa et al, 2000), es un método usado para la amplificación selectiva in vitro de una región particular del genoma viral. Estas moléculas sintéticas pueden ser utilizadas como componente de un DNA recombinante o como sonda en un test de hibridación. El principio de esta técnica es que moléculas de ácido nucleico marcadas, conocidas como sondas, se unen específicamente a las secuencias complementarias del ácido nucleico que se investiga, en este caso el cDNA del vDVB. Debido a la complementariedad entre la sonda y el ácido nucleico vírico, esta unión es específica.

El diagnóstico por PCR del VDVB, se hace sobre órganos homogeneizados (enfermedad aguda) o suero (infección persistente). En el caso de la DVB, el RNA vírico debe ser purificado y transcrito a DNA complementario (cDNA), mediante una enzima transcriptasa reversa (Pellerin et al, 1994; Van Oirschot, 1999)

Control y prevención

El conocimiento detallado de la epidemiología de la DVB y del comportamiento de las pruebas diagnósticas en uso son esenciales para la identificación de animales virémicos (animales PI y animales con infección aguda), que son la fuente más importante de diseminación viral en hatos afectados (Sandvik, 1999).

Un programa de prevención, control o erradicación de una enfermedad puede adoptar distintas estrategias que van a variar de acuerdo a la situación inicial de la explotación, pero apoyadas en tres pilares fundamentales que son: las medidas de bioseguridad, identificación y remoción de los animales PI y vacunación contra VDVB en el rodeo (Muñoz; Zanzi et al, 2000; Ames y Baker, 1990; Bitsch y Ronsholt, 1995).

- Bioseguridad, la implementación de medidas de bioseguridad están dirigidas a evitar el ingreso del vDVB, así como su difusión dentro del hato, a través del control estricto de todos los animales que se incorporan, los cuales deben ser seronegativos al virus antes y después de la cuarentena estricta, evitar el contacto directo o indirecto con otros hatos, evitar el servicio con semen sin certificación de ser libre de la enfermedad.
- Identificación y eliminación de animales PI, estrategia indispensable por la importancia epidemiológica de estos animales.
- Inmunización con vacunas de virus muerto o modificado, con el objetivo de prevenir la infección congénita, así como para evitar las infecciones postnatales (Van Oirschot et al, 1999).

Vacunas

Una complicación para el desarrollo de las vacunas contra el vDVB es la diversidad antigénica. La tendencia es identificar la mayor cantidad de variantes antigénicas e incluirlos en la vacuna.

Enfermedades sistémicas o multiorgánicas (2da parte)

Curso de Enfermedades de los rumiantes y cerdos.

Dr. Gabriel Eduardo, Travería
Dra. María Fiorella, Alvarado Pinedo.

Las evaluaciones realizadas a las vacunas existentes dieron resultados muy variados, tanto para la infección postnatal como para la infección prenatal (Van Oirschot et al, 1999).

Vacuna a virus activo modificado.

La vacuna a virus activo modificado contra la DVB, esta asociada a una gran variedad de efectos adversos, tales como la inducción de la EM, infección fetal e inmunosupresión, pueden potenciar infecciones recurrentes, resultando en un incremento en la incidencia de enfermedades respiratorias (Potgieter, 1995; Van Oirschot et al, 1999).

Existen más de 140 vacunas autorizadas en USA, todas satisfacen requerimientos como pureza, potencia, y seguridad; garantizando una respuesta inmune libres de agentes extraños. La vacuna a virus activo modificado, usualmente contiene un solo biotipo de virus de la DVB citopatogénico. Los biotipos citopáticos usados usualmente son vDVB - NADL, VDVB- Singer, VDVB- C24V (Bolin, 1995b).

Las ventajas de uso de una vacuna a virus activo modificado para controlar la DVB son:

- La vacuna a virus activo modificado, estimula una rápida respuesta inmune y la protección se establece muy fácilmente dentro de 3 semanas post vacunación, ya se detecta anticuerpos en suero y neutraliza al vDVB.
- La duración de los anticuerpos en sueros post vacunación con vacunas a virus activo modificado, es similar a la provocada por infección natural, permaneciendo en esto en altos niveles por más de un año y persisten por varios años. Sin embargo en algunos animales los anticuerpos neutralizantes contra el vDVB desaparecen dentro de dos años post vacunación (Bolin, 1995)
- Son menos costosas.

Las desventajas asociadas a la vacuna a virus activo modificado, están asociadas al fracaso en la inmunización por:

- Falla en el almacenamiento o manipulación lo cual puede provocar una enfermedad postnatal producto de la reactivación de la virulencia del virus vacunal; además, existe el riesgo de contaminación de las líneas celulares y suero fetal bovino utilizado en la producción de las vacunas con vDVB nocitopatogénico.
- Estas fallas están asociadas con enfermedad de las mucosas y fracasos reproductivos asociados al virus vacunal. La enfermedad de las mucosas ocurre 1 a 4 semanas post vacunación (Bolin, 1995b). Por ello, la vacuna a virus activo modificado no es recomendado para hembras preñadas.
- Pueden ocasionar aborto.
- La inmuno supresión y la recombinación genética son otros potenciales problemas asociados con vacuna a virus activo modificado.

Enfermedades sistémicas o multiorgánicas (2da parte)

Curso de Enfermedades de los rumiantes y cerdos.

Dr. Gabriel Eduardo, Travería

Dra. María Fiorella, Alvarado Pinedo.

Vacuna Inactivada

Las ventajas del uso de este tipo de vacunas esta relacionada a las desventajas del uso de las vacunas a virus activo modificado; sin embargo las desventajas de este tipo de vacuna inactivada esta relacionada con la necesidad de usar 2 dosis de vacuna y esto a su vez retrasa el tiempo necesario para que se establezca una inmunidad protectora. (Bolin, 1995). A su vez, la duración de inmunidad inducida es corta. (Van Oirschot, 1999).

Carbunco Bacteridiano

Introducción.

El carbunco es una enfermedad aguda, infectocontagiosa, zoonótica, que afecta principalmente a los rumiantes (vacunos y ovejas) si bien puede afectar a todos los vertebrados. Es producida por un bacilo Gram positivo el *Bacillus anthracis*, presenta la capacidad de formar esporas que pueden perdurar viables en el medio ambiente por años (hasta 50), además como factores de virulencia forma una cápsula de poli-D-glutámico, antifagocítico y toxina tripartita: factor edematoso, antígeno protector y factor letal, el factor protector es esencial para que actúen los otras dos factores. La producción de la toxina y la formación de cápsula se encuentran reguladas por plásmidos. Los esporos provenientes de un animal muerto contaminan el suelo y el agua.

Se considera que la mayor parte de los animales se infectan al consumir alimentos contaminados, la picadura de insectos, también puede facilitar la diseminación de la enfermedad.

Factores ambientales

Los brotes originados por el suelo suelen estar relacionados con un cambio climático importante como lluvias importantes después de sequías prolongadas y en tiempo caluroso cuando con temperaturas superiores a los 15°C. En terrenos húmedos se pueden encontrar flotando en el agua y al evaporarse quedarían en la superficie. Otro factor es la presencia de pastos duros y ásperos ocasionando abrasiones en la mucosa que faciliten su ingreso.

En los humanos se conoce el carbunco cutáneo, digestivo y respiratorio, de consecuencias fatales si no se trata a tiempo.

Patogenia

Cuando el espora ingresa en la mucosa íntegra o por abrasiones en la mucosa, los organismos resisten la fagocitosis por la presencia de la cápsula, proliferan en el ganglio de drenaje regional, pasando por los vasos linfáticos a la circulación sanguínea en donde se produce la septicemia con invasión de todos los tejidos del cuerpo. Las toxinas producen edema y daño tisular produciendo la muerte por shock y anoxia final. El período de incubación puede ser de 1 – 2 semanas.

Enfermedades sistémicas o multiorgánicas (2da parte)

Curso de Enfermedades de los rumiantes y cerdos.

Dr. Gabriel Eduardo, Travería
Dra. María Fiorella, Alvarado Pinedo.

Signos clínicos

Los animales se pueden encontrar muertos sin signos premonitorios con un curso de 1-2 horas o pueden observarse fiebre, temblor muscular, disnea, colapso y muerte.

Hallazgos de necropsia

Los animales presentan ausencia de rigidez cadavérica y se descomponen rápidamente. Se suele observar presencia de exudado sanguinolento oscuro por todos los orificios naturales, que no coagula. No se recomienda abrir el animal para evitar la diseminación de la bacteria a través de las esporas que se formarán cuando las formas vegetativas entran en contacto con el oxígeno, de lo contrario al no entrar en contacto con el oxígeno estas formas vegetativas mueren con los procesos de descomposición. De ser necesaria la necropsia se deberá tener especial cuidado en la eliminación del cadáver en el lugar, ya sea quemando o enterrando el cadáver y secreciones, además de tomar las precauciones tendientes a evitar el contagio de las personas que intervengan en la necropsia.

A la necropsia se puede observar ausencia de coagulación de la sangre, edemas subcutáneos, equimosis generalizada, presencia de líquido seroso sanguinolento de las cavidades, enteritis graves y esplenomegalia.

Diagnóstico

En el diagnóstico intervienen como en otras enfermedades la epidemiología y el envío de muestras para intentar el aislamiento de la bacteria, la muestra de elección suele ser un hueso largo del cual se intentará aislar el germen a partir de la médula ósea.

Tratamiento

No suele realizarse por lo agudo de la enfermedad pero puede indicarse penicilina (20.000 unidades por kg de peso 2 veces al día), estreptomycin (8 – 10 gr. día 2 dosis intramuscular y oxitetraciclina (parenteral 5 mg/kg diario).

Vacunación

Se utiliza una cepa (Sterne) de vacuna viva, atenuada, esporulada, acapsulada y acapsulógena. Se suele indicar la vacunación en forma anual, pero en algunos casos en donde el desafío es importante en casos de brotes de la enfermedad puede indicarse una revacunación anual cada 6 meses.

El manejo de la enfermedad queda limitado a la prevención por la vacunación anual de los animales a partir del 1-2 años de vida dependiendo del desafío.

Bibliografía

Medicina Veterinaria (2002) Radostitis OM, Gay CC, Blood DC, Hinchcliff KW. Ed McGraw-Hill Interamericana. ISBN: 84-486-0318-4.