

Lama glama* con signología y lesiones compatibles con paratuberculosis causadas por *Mycobacterium avium* subesp. *avium

Jorge, M.C.¹; Traversa, M.J. ¹; Schettino, D.M. ¹; Giordano, A. ¹; Etchechoury, I.⁴;
Sanz, H.¹; Romero, C. ²; Grand, H. ²; Paolicchi, F. ³; Romano, M.I. ⁴

RESUMEN

Los camélidos sudamericanos (CS) incluyen cuatro especies, guanaco, vicuña, alpaca y llama (*Lama glama*). En Argentina las llamas eran consideradas fauna y actualmente ganado, revalorizando su carne, fibra, cueros y pieles, también son un medio de subsistencia. Los CS son susceptibles a las enfermedades ocasionadas por micobacterias. El diagnóstico presuntivo se realiza por los signos clínicos y los hallazgos de necropsia y se confirma por técnicas bacteriológicas, moleculares e histopatología. El objetivo de este trabajo es describir un caso clínico con signos compatibles de paratuberculosis y el diagnóstico de laboratorio en una llama en cautiverio perteneciente a un zoológico de Olavaria, Provincia de Buenos Aires. En la necropsia se observaron caquexia y lesiones granulomatosas en yeyuno, íleon y linfonodos mesentéricos compatibles con paratuberculosis, en los frotis directos y en la histopatología se observaron bacilos ácido-alcohol resistentes. Se confirmó la presencia de *M. avium* subesp. *avium* por bacteriología y por PCR fue detectada la IS1245 característica de este agente, no detectando la IS900 correspondiente a *M. avium* subesp. *paratuberculosis*. Esto permitió arribar al diagnóstico etiológico, combinando técnicas, de un caso de enteritis granulomatosa en llamas causado por *M. avium* subesp. *avium*. con signología y lesiones compatibles con paratuberculosis.

Palabras clave: enteritis granulomatosa, *Lama glama*, *Mycobacterium avium* subesp. *avium*, paratuberculosis

ABSTRACT

Sudamerican camelids (SC) include four species, guanaco, vicuña, alpaca and llama (*Lama glama*). In Argentina llamas were considered as wildlife species but now they are considered as cattle, their meat, wool, leather and skin is more valuable and they are also a mean for surviving. SC are susceptible hosts of mycobacterial infections. Presumptive diagnoses is based on clinical signs and necropsy findings and is confirmed by bacterial isolation, molecular identification and histopathology. The objective of this publication is to describe a clinical case with signs consistent with paratuberculosis and the laboratory diagnosis in a captive llama from a zoo garden in Olavarría, Buenos Aires province. During necropsy were observed cachexia and granulomatous lesions resembling

paratuberculosis in jejunum, ileon and mesenteric lymph nodes. In direct smears and histopathology fast acid alcohol bacilis were detected. *M. avium* subsp. *avium* was confirmed with bacteriology and by PCR the specific probe IS1245 was detected, IS900 *M. avium* subsp. *paratuberculosis* specific probe was not demonstrated. These allowed to confirm the etiology, combining techniques, of a granulomatous enteritis case in llamas caused by *M. avium* subsp. *avium* with clinical signs and lesions resembling paratuberculosis.

Key words: granulomatous enteritis, *Lama glama*, *Mycobacterium avium* subsp. *avium*, paratuberculosis

¹ Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional del Centro de la Provincia de Buenos Aires, Pinto 399, (7000) Tandil. Pcia. de Buenos Aires. mcjorge@vet.unicen.edu.ar

² Zoológico La Máxima, Municipalidad de Olavarría, Avenida Pellegrini 4200, (7400) Olavarría. Pcia. de Buenos Aires.

³ Estación Experimental Agropecuaria INTA Balcarce. Ruta 226 Km 73,5, CC 276 (7620) Balcarce. Pcia. de Buenos Aires.

⁴ Instituto de Biotecnología, CICV y A, INTA Castelar. De Los Reseros y De Las Cabañas, CC 25, (1712) Castelar. Pcia. de Buenos Aires.

INTRODUCCIÓN

Los camélidos sudamericanos (CS) son mamíferos, miembros de la familia *Camelidae*, orden *Artiodactyla*, estrechamente relacionados entre sí y denominados colectivamente como lamoids. Incluye cuatro especies, guanaco, vicuña, alpaca y llama (*Lama glama* Linnaeus, 1758) ¹. La domesticación de las llamas data de 5000 años y en la actualidad se ha revalorizado su carne porque posee proteínas de alto valor nutricional y bajo contenido en colesterol. La fibra, cueros y pieles se utilizan en la fabricación de indumentaria industrial y artesanal. También se utiliza como mascota, para carga como alternativa turística sustentable y animal de guardia en los rebaños para evitar la predación ^{10,11}.

En Argentina las llamas que anteriormente eran consideradas fauna se declararon ganado con la inclusión en el Artículo 2º de la Ley nº 21.740 mediante el decreto 220/96 del Poder Ejecutivo Nacional. También son un medio de subsistencia en zonas no aptas para la ganadería y la agricultura. La existencia en el país es de 800.000 CS de los cuales un tercio son llamas distribuidas en todo el territorio, mientras que en Perú y Bolivia se concentran el 93% de las llamas en Sudamérica¹⁰.

Los CS son susceptibles a las enfermedades ocasionadas por micobacterias entre ellas a la tuberculosis y paratuberculosis ^{9, 18, 19}, esta última es una enteritis crónica granulomatosa ocasionada por el *Mycobacterium avium* subesp. *paratuberculosis* (Map). En los rumiantes es una de las enfermedades más frecuentes y la existencia e importancia de los reservorios silvestres aún no han sido determinadas. En animales no rumiantes se han registrado infecciones naturales y experimentales, entre ellos los CS ^{13, 22} en quienes la edad de

presentación de los signos clínicos es más temprana que en los bovinos ^{11, 20}. El signo primario es la pérdida de peso y en el 10 a 20 % de los casos se observa diarrea en el estadio final de la enfermedad y ocasionalmente hipoproteinemia y edema intermandibular ¹¹.

El diagnóstico diferencial en las llamas se debe hacer con otras causas debilitantes que ocasionen pérdida de peso como parasitismo, abscesos por *Corynebacterium pseudotuberculosis* y mala nutrición. En los hallazgos de necropsia se observa engrosamiento y corrugamiento de la mucosa del intestino delgado y colon y aumento de los linfonodos mesentéricos, infecciones diseminadas también han sido documentadas en llamas ²⁰. Una alpaca infectada con *Mycobacterium avium* subesp. *avium* presentó signos clínicos y lesiones histológicas indistinguibles de *Map*, sólo diferenciados por la no dependencia a la micobactina y por PCR ¹⁵.

El diagnóstico de micobacteriosis en llamas se realiza por los signos clínicos y los hallazgos de necropsia y se confirma por el cultivo bacteriológico y la histopatología, considerados los métodos estándar ^{14, 20}. Las pruebas de biología molecular, serológicas y alérgicas son de valor diagnóstico ⁴. Los resultados de la aplicación de las pruebas intradérmicas en CS son controvertidos debido a los resultados falsos positivos y negativos registrados ^{19, 21}.

En el diagnóstico histopatológico la detección de bacilos ácido alcohol resistentes y cambios histológicos son sugestivos, pero no definitivos de la infección con *Map*, porque otras micobacterias causan lesiones similares ⁴. Las lesiones histopatológicas en ovejas y cabras se han clasificado en focales, difusas multibacilares, linfocíticas difusas y difusas mixtas ⁷ y para otros autores en focal,

multifocal y difusa ³. En llamas si bien no hay una clasificación definida de las lesiones se caracterizan por un infiltrado moderado de macrófagos, linfocitos y plasmocitos en la lámina propia, células epiteloides con citoplasma anfófilico, presencia de bacilos ácido alcohol resistentes y linfadenitis granulomatosa en linfonodos mesentéricos, también se pueden observar granulomas multifocales en hígado, útero, riñón y ojos ⁴.

Cuando el diagnóstico clínico es compatible con paratuberculosis la serología también se ha utilizado en CS, la inmunodifusión en gel de agar (AGID) es específica y poco sensible, pero tiene la ventaja que pueden utilizarse los mismos reactivos que para ovinos y bovinos ^{4, 20}. En un estudio en rodeos de llamas y alpacas el AGID presentó un 100% de especificidad, mientras que utilizando tres diferentes protocolos de ELISA la especificidad osciló entre el 48 % y el 98 %, siendo uno de ellos ELISA proteína G, útil en el diagnóstico multiespecie ¹⁶. Un ELISA bovino disponible comercialmente fue modificado con el agregado de un conjugado camélido específico para determinar anticuerpos en CS, esta prueba en los resultados preliminares demostró una sensibilidad de 67 % y una especificidad del 99 % ^{14, 20}. Estas pruebas serológicas utilizadas en animales mayores de un año tienen un valor diagnóstico precoz especialmente en animales con signos clínicos y en rodeos con exposición a la infección se recomiendan como prueba tamiz, pero siempre los resultados deben ser confirmados por cultivo tradicional o radiométrico ^{4, 14, 16}.

El objetivo de este trabajo es describir un caso clínico con signos compatibles de paratuberculosis y el diagnóstico de laboratorio en una llama en

cautiverio perteneciente a un zoológico ubicado en Olavarría, provincia Buenos Aires.

MATERIALES Y MÉTODOS

El ejemplar en estudio fue una llama (*Lama glama*) gestante de 7 años proveniente del zoológico "La Máxima" de la ciudad de Olavarría, que presentó pérdida de estado progresivo durante dos meses y diarrea 25 días previos a la muerte. Las muestras de intestino y linfonodos fueron remitidas para bacteriología refrigeradas y para histopatología en formol al 10%. El diagnóstico bacteriológico se realizó mediante tinción de Ziehl-Neelsen (ZN) y cultivo en medios de Herrold con y sin micobactina; el histopatológico con técnica de parafina y coloración de hematoxilina eosina (HE) y de ZN. Todas las técnicas se realizaron siguiendo los procedimientos estandarizados para micobacterias por la Oficina Internacional de Epizootias.

A las cepas aisladas e identificadas *a-priori* como pertenecientes al complejo *M. avium* se aplicó la técnica de PCR investigando la presencia de las secuencias de ADN IS900 (Map) e IS1245 (*M. avium* subesp. *avium*). La extracción del ADN genómico se realizó con cloroformo isoamílico según procedimientos estándar² y se cuantificó mediante espectrofotómetro (Nanodrop ND - 1000). Se realizó PCR sobre los segmentos de inserción IS900 e IS1245 siguiendo los protocolos descritos por Guerrero y Bernasconi¹². Los productos de la amplificación fueron sembrados en gel de agarosa al 0,8 % y visualizados con luz UV (Gel – Doc, Biorad).

RESULTADOS

En la necropsia se observaron caquexia y lesiones granulomatosas en yeyuno, íleon y linfonodos mesentéricos compatibles con paratuberculosis (Figura 1), sin lesiones aparentes en otros órganos. Bacilos ácido alcohol resistentes en *cluster* se evidenciaron en los frotis directos de los órganos. El aislamiento resultó positivo obteniendo el desarrollo de colonias no cromógenas en los medios de Herrold con y sin micobactina luego de dos semanas de incubación. La cepa aislada presentó coloración de ZN positiva, desarrollo a 25°, 37° y 45°C y pruebas bioquímicas compatibles con *M. avium* subesp. *avium*. En los cortes histológicos se observó la presencia de numerosos bacilos ácido alcohol resistentes (Figura 2). La histopatología con HE en intestino demostró edema y acumulación de células inflamatorias en mucosa y submucosa con infiltración de células epitelioides, macrófagos y linfocitos (Figura 3), y en linfonodo múltiples focos de necrosis con tejido conectivo incipiente.

Por PCR fueron detectadas secuencias de ADN correspondientes a *hsp65* presentes en todas las micobacterias y la secuencia de inserción IS1245 característica de *M. avium* subesp. *avium*, no habiéndose detectado las secuencias de inserción IS900 correspondientes a *M. avium* subesp. *paratuberculosis* (Figura 4).

DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

En Sudamérica muchos animales en zoológicos son afectados por diversas infecciones, entre ellas por micobacterias, mientras que en su hábitat natural son raramente reportadas, esto sugiere que bajo condiciones naturales estos animales

no son altamente susceptibles a las infecciones micobacterianas. Los CS representan una fuente potencial de infección zoonótica que han incrementado su popularidad y tienen estrecho contacto con los humanos cuando son utilizados como animales de *trekking* o en zoológicos, especialmente con niños, ¹⁸.

M. avium subesp. *paratuberculosis* tiene un rango de huéspedes mucho más amplio que el conocido, si llegara a presentar ciclos salvajes se dificultarían aún más los programas de control. Pero la infección con *M. avium* subesp. *avium* en rumiantes es esporádica y como es considerada una enfermedad poco contagiosa no existen medidas regulatorias ni de vigilancia epidemiológica ¹⁴.

En el ciclo silvestre son reservorios de infección para los animales domésticos y los factores que intervienen en la transmisión incluyen la duración de la interacción y la distancia entre los huéspedes infectados y susceptibles, el efecto del tiempo sobre la viabilidad de los bacilos excretados en el ambiente, el estado sanitario de las poblaciones silvestres y la variación de acuerdo a la especie. Se ha determinado el posible rol epidemiológico de las ovejas en la paratuberculosis bovina cuando pastan en los mismos potreros o en pasturas fertilizadas con materia fecal ^{6, 17}.

Los signos clínicos, las lesiones macro y microscópicas y la coloración positiva de ZN permitieron inferir que este ejemplar padecía paratuberculosis, pero al realizar cultivo, tipificación bioquímica y PCR a la cepa aislada se identificó como *M. avium* subesp. *avium*.

En el mundo hay muy pocos registros de paratuberculosis en las poblaciones de CS y hasta el momento la prevalencia es baja, pero la industria de

estas especies continúa ganando popularidad y ocurrirían grandes pérdidas económicas si la enfermedad comienza a establecerse y diseminarse ya que la infección en los CS al igual que en los bovinos puede permanecer indetectable durante un prolongado período ¹⁴.

Este caso demuestra la importancia de las técnicas bacteriológicas y de biología molecular para la identificación y diferenciación de *Map* de otras micobacterias ⁸, porque en este ejemplar los signos clínicos y las lesiones micro y macroscópicas ocasionados por *M. avium* subesp. *avium* fueron indiferenciables de los producidos por *Map*, esta misma situación fue descrita por Lucas y cols. en una alpaca ¹⁵.

El conocimiento sobre el potencial error diagnóstico en estas especies de CS constituye una alerta que contribuirá a la implementación de medidas de manejo sanitario adecuadas.

El control está basado en dos estrategias sanitarias que consisten en evitar las fuentes de infección y la vacunación. Actualmente se están desarrollando nuevas vacunas ¹³ dado que en otras especies silvestres este método ha presentado resultados promisorios ²⁰.

En el presente trabajo se logró arribar al diagnóstico etiológico, combinando técnicas, de un caso de enteritis granulomatosa causado por *M. avium* subesp. *avium* en llamas con signología y lesiones compatibles con paratuberculosis. La difusión de este hallazgo evitará errores en el diagnóstico clínico e histopatológico de paratuberculosis en CS.

BIBLIOGRAFÍA

- 1.- Álvarez Romero J, Medellín R A. *Lama glama* vertebrados superiores exóticos en México, diversidad, distribución y efectos potenciales. Instituto de Ecología.- Universidad Autónoma de México. Bases de Datos SNIB- CONABIO- Proyecto U020- México DF. 2005; 1-6
- 2.- Ausubel, F. M.; R. Brent; R. E. Kingston; D. D. Moore; J. A. Smith; J. G. Seidman and K. Struhl. 1988. Current protocols in molecular biology. Greene Publishing Associates, Brooklyn, N. Y.
- 3.- Balseiro A, Prieto J M, Espí A, Pérez V, García Martín J F. Presence of focal and multifocal paratuberculosis lesions in mesenteric lymph nodes and the ileocaecal valve of cattle positive to the tuberculin skin test. *Vet J* 2003; 166: 210-212
- 4.- Belnap E B, Getzy D M, Jonson LW, Ellis R P, Thompson G L, Shulaw, W P. *Mycobacterium paratuberculosis* infection in two llamas. *J Am Vet Med Assoc* 1994; 294 (11): 1805-1808
- 5.- Clarke C J. The Pathology and Pathogenesis of Paratuberculosis in Ruminants and Other Species. *J Comp Path*; 1997; 116: 217-261
- 6.- Corner L A L. The role of wild animal populations in the epidemiology of tuberculosis in domestics animals: How to assess the risk. *Vet Microbiol* 2006;112: 303-312
- 7.- Corpa J.M, Garrido J, García Martín J.F, Pérez V. Classification of Lesions Observed in Natural Cases of Paratuberculosis in Goats. *J. Comp. Path.* 2000; 122: 255-265
- 8.- Cousins D V, Williams S N, Hope A, Eamens G J. DNA fingerprinting of Australian isolates of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* using IS900 RFLP. *Aust Vet J.* 2000; 78(3): 184-190
- 9.- Feizabadi M M, Robertson I D, Hope A, Cousins D V, Hampson D J. Differentiation of Australian isolates of *Mycobacterium paratuberculosis* using pulsed-field gel electrophoresis. *Aust Vet J* 1997; 75(12): 887-889
- 10.- Fidanza I, Casas J C En la tierra de la llama. *El Federal* 2005; Año 2 (76): 26-37
- 11.- Findlay G, Newth R. Submission by BLAA and Causal to the Royal Society Inquiry into Infectious Diseases in Livestock. British Llama & alpaca Association. Appendix SAC-2, 2001; 8-9
- 12.- Guerrero, C, Bernasconi, C, Burki, D, Bodmer, T, Telenti, A. A novel insertion element from *Mycobacterium avium*, *IS1245*, is a specific target for analysis of strain relatedness. *J. Clin. Microbiol.* 1995 33: 304-307

- 13.- Harris NB, Barletta R G. *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in Veterinary Medicine. Clin Microbiol Reviews 2001; 14 (3): 489-512
- 14.- Kramsky J A, Miller DS, Hope A, Collins M T. Modification of a bovine ELISA to detect camelid antibodies to *Mycobacterium paratuberculosis*. Vet.Microbiol 2000; 77: 333-337
- 15.- Lucas J N, Cousins DV, Mills AJ, van Wijk JGA. Identification of *Mycobacterium avium* subsp. *avium* in an alpaca with lesions resembling paratuberculosis. Aust Vet J 2003; 81(9): 567-569
- 16.- Miller DS, Collins MT, Smith BB, Anderson PR, Kramsky J, Wilder G, Hope A. Specificity of four serologic assays for *Mycobacterium avium* subsp. Paratuberculosis in llamas and alpacas: a single herd study J Vet Diagn Invest 2000; 12 (4): 345-353
- 17.- Muskens J, Bakker D, de Boer J, van Keulen L. Paratuberculosis in sheep: its possible role in the epidemiology of paratuberculosis in cattle. Vet Microbiol 2001; 78 (2): 101-109
- 18.- Oevermann A, Pfyffer G.E, Zanolari P, Meylan M, Robert N Generalized tuberculosis in llamas (*Lama glama*) Due to *Mycobacterium microti*. J Clin Microbiol 2004; 42 (4): 1818-1821
- 19.- Ridge SE, Harkin JT, Barman RT, Mellor AM, Larsen JW. Johne's disease in alpacas (*Lama pacos*) in Australia. Aust Vet J 1995; 72 (4): 150-153
- 20.- Stehman SM. Paratuberculosis in small ruminants, deer, and South American Camelids. Vet Clin North Am Food Anim Pract 1996; 12 (2): 441-455
- 21.- Stevens JB, Thoen C, Rohoney EB, Tessaro S, Kelly HA, Duncan JR. The Immunological Response of llamas (*Lama glama*) Following Experimental Infection with *Mycobacterium bovis*. Can J Vet Res 1998; 62: 102-109
- 22.- Williams ES, Zinder SP, Martin KL. Pathology of Spontaneous and Experimental Infection of North American Wild Ruminants with *Mycobacterium paratuberculosis* Vet Pathol 1983, 20: 274-291