

Lama glama con signología y lesiones compatibles con paratuberculosis causadas por *Mycobacterium avium* subespecie *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 Olavarría, Provincia de Buenos Aires. En la necropsia se observaron 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 en cluster. Se confirmó la presencia de *Mycobacterium avium* subespecie *avium* por bacteriología y por PCR fue detectada la IS1245 característica de este agente, no detectando la IS900 correspondiente a *Mycobacterium avium* subespecie *paratuberculosis*. Esto permitió arribar al diagnóstico etiológico, combinando técnicas, de un caso de enteritis granulomatosa en llamas causado por *Mycobacterium avium* subespecie *avium* con signología y lesiones compatibles con paratuberculosis.

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

Lama glama with signology and lesion compatible with paratuberculosis and injuries caused by *Mycobacterium avium* subespecies *avium*

Summary

Guanaco, vicuña, alpaca and llama (*Lama glama*) are also known as Sudamerican camelids (SC). In Argentina llama was considered non profitable wildlife specie but now it is considered a mean for surviving because their meat, wool, leather and skin is valuable. SC are susceptible hosts of mycobacterial infections. A presumptive diagnosis is based on clinical and necropsy findings and is confirmed with bacterial isolation, molecular identification and histopathology. The objective of this publication is to describe a clinical case with clinical

¹Facultad 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 - ²Zoológico La Máxima, Municipalidad de Olavarría, Avenida Pellegrini 4200, (7400) Olavarría. Pcia. de Buenos Aires. - ³Estación Experimental Agropecuaria INTA Balcarce. Ruta 226 Km 73,5, CC 276 (7620) Balcarce. Pcia. de Buenos Aires. -

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

Recibido: 20/06/08 - Aceptado: 09/11/08

and necropsy findings consistent with paratuberculosis and its laboratory diagnosis in a captive llama from a zoo garden in Olavarría, Buenos Aires province. During necropsy granulomatous lesions resembling paratuberculosis in jejunum, ileon and mesenteric lymph nodes were observed. In direct smears and histopathology acid fast bacilli in clusters were detected. *Mycobacterium avium* subespecie *avium* was confirmed with bacteriology and the specific probe IS1245 was detected by PCR, IS900 *Mycobacterium avium* subespecie *paratuberculosis* specific probe was not demonstrated. These allowed confirming the etiology of a granulomatous enteritis case in llamas caused by *Mycobacterium avium* subespecie *avium* with clinical signs and lesions resembling paratuberculosis.

Key words: granulomatous enteritis, Lama glama, Mycobacterium avium subespecie avium, paratuberculosis

Introducción

Los camélidos sudamericanos (CS) son mamíferos, miembros de la familia *Camelidae*, orden *Artiodactyla*, estrechamente relacionados entre sí e 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^{11,12}.

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 territorio¹¹.

Los CS son susceptibles a las enfermedades ocasionadas por micobacterias entre ellas a la tuberculosis y paratuberculosis^{10, 16, 18}, esta última es una enteritis crónica granulomatosa ocasionada por el *Mycobacterium avium* subespecie *paratuberculosis*. En los rumiantes

es una de las enfermedades más frecuentes y la existencia e importancia de los reservorios silvestres aún no han sido determinadas³. 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^{12, 19}. 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 hipoproteïnemia y edema intermandibular¹².

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 llamas¹⁹. Una alpaca infectada con *Mycobacterium avium* subespecie *avium* presentó signos clínicos y lesiones histológicas indistinguibles de *Mycobacterium avium* subespecie *paratuberculosis*, sólo diferenciados por la no dependencia a la micobactina y por PCR¹⁵.

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, 19}. Las pruebas de biología molecular, serológicas y alérgicas son de valor diagnóstico⁴. Los resultados de la aplicación de las pruebas intradérmicas en

CS son controvertidos debido a los resultados falsos positivos y negativos registrados^{17, 20}.

En el diagnóstico histopatológico la detección de bacilos ácido alcohol resistentes y cambios histológicos son sugestivos, pero no definitivos de la infección con *Mycobacterium avium* subespecie *paratuberculosis*, porque otras micobacterias causan lesiones similares⁴. En llamas si bien no hay una clasificación definida de las lesiones, como existe en otras especies⁸, las mismas se caracterizan por un infiltrado moderado de macrófagos, linfocitos y plasmocitos en la lámina propia, células epitelioides con citoplasma anfofilico, presencia de bacilos ácido alcohol resistentes y linfadenitis granulomatosa en linfonodos mesentéricos, también se pueden observar granulomas multifocales en hígado, útero, riñón y ojos⁴.

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 Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE)¹⁷. Las pruebas realizadas fueron velocidad y temperatura de desarrollo, producción de pigmento, catalasa, reducción de nitritos a ni-

tratos, ureasa, hidrólisis del Tween y reducción del telurito.

A las cepas aisladas e identificadas *a-priori* como pertenecientes al complejo *Mycobacterium avium* se aplicó la técnica de PCR investigando la presencia de las secuencias de ADN IS900 (*Mycobacterium avium* subespecie *paratuberculosis*) e IS1245 (*Mycobacterium avium* subespecie *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 Collins y cols.⁶. 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 atrofia gelatinosa del tejido adiposo 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 *Mycobacterium avium* subespecie *avium*. Los resultados de las mismas fueron catalasa, nitrato reductasa, ureasa e hidrólisis del Tween negativas y reducción del telurito positiva. En los cortes histológicos se observó la presencia de numerosos bacilos ácido alcohol resistentes en clusters (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.



Figura 1. Lesiones macroscópicas. Referencias: Intestino delgado y linfonodos de *Lama glama*

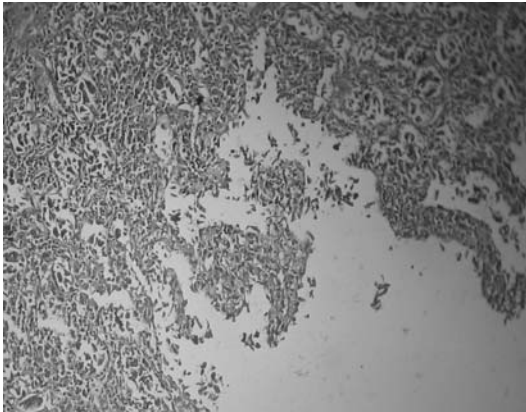


Figura 2. Coloración de Hematoxilina y Eosina corte histológico. Referencias: Intestino delgado de *Lama glama*. 40X

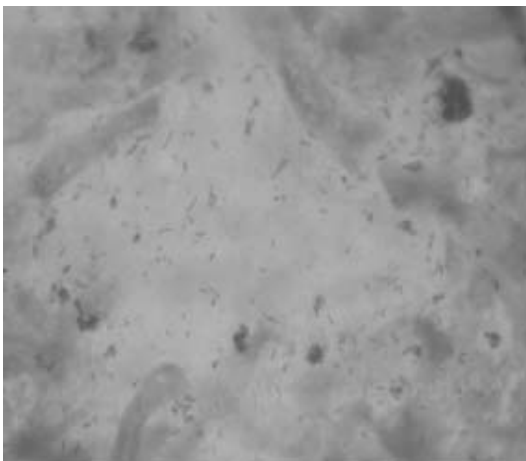


Figura 3. Coloración de Ziehl Neelsen corte histológico. Referencias: Intestino delgado de *Lama glama*. 100 X

Por PCR fueron detectadas secuencias de ADN correspondientes a *hsp65* presentes en todas las micobacterias y la secuencia de inserción *IS1245* característica de *Mycobacterium avium* subespecie *avium*, no habiéndose detectado las secuencias de inserción *IS900* correspondientes a *Mycobacterium avium* subespecie *paratuberculosis* (Figura 4)²¹.

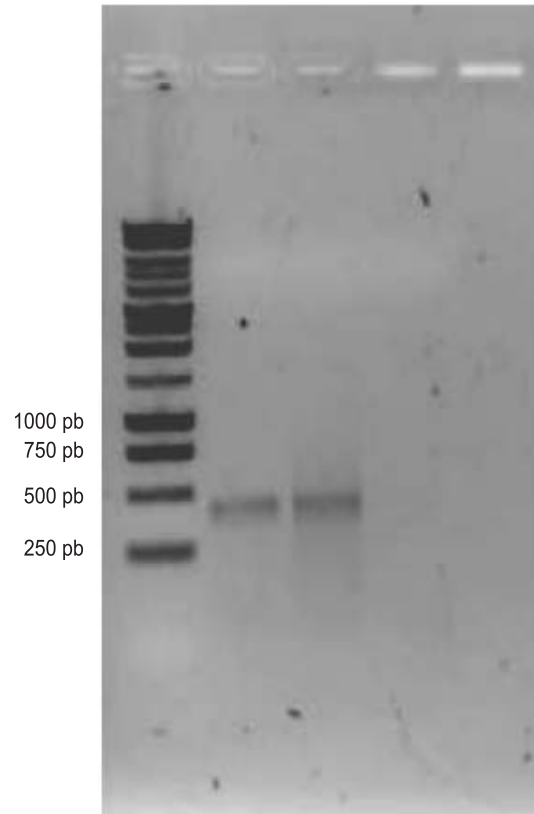


Figura 4. PCR *IS1245* del aislamiento de llama. Calle 1: marcador peso molecular 1 Kb (Promega). Calle 2: cepa aislada en medio Herrold con y sin micobactina. Calle 3: control positivo (*M. avium* D4 ER). Calle 4: control negativo (*M. tuberculosis*)

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 en las caminatas en montaña (trekking) como animales de carga o en zoológicos¹⁶.

Mycobacterium avium subespecie *paratuberculosis* tiene un rango de huéspedes mucho más amplio que el conocido, si el mismo llegara a presentar ciclos salvajes se dificultarían aún más los programas de control. Pero la infección con *Mycobacterium avium* subespecie *avium* en ruminantes es esporádica y como es considerada una enfermedad poco contagiosa no existen medidas regulatorias ni de vigilancia epidemiológica^{7, 14}.

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 período¹⁴.

Los signos clínicos, las lesiones macro y microscópicas y la coloración positiva de ZN llevaron al diagnóstico presuntivo de paratuberculosis. Pero al realizar cultivo, tipificación bioquímica y PCR a la cepa aislada se identificó *Mycobacterium avium* subespecie *avium*. Esto demuestra la importancia de las técnicas bacteriológicas y de biología molecular⁹, porque en este ejemplar los signos clínicos y las lesiones micro y macroscópicas ocasionados por el agente aislado fueron indiferenciables de las causadas por *Mycobacterium avium* subespecie *paratuberculosis*. Nuestros hallazgos concuerdan con los resultados de Lucas y cols. quienes identificaron *M. avium* subespecie *avium* en una alpaca con lesiones semejantes a paratuberculosis¹⁵.

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 vacunas¹³ dado que en otras especies silvestres este método ha presentado resultados promisorios¹⁹.

En el presente trabajo se logró arribar al diagnóstico etiológico, combinando técnicas, de un caso de enteritis granulomatosa causado por *Mycobacterium avium* subespecie *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 UO20*- México DF. 2005; 1-6
- 2 Ausubel, F.M.; Brent, R.; Kingston, R. E.; Moore, D.D.; Smith, J. A.; Seidman, J.G. and Struhl, K. 1988. *Current protocols in molecular biology*. Greene Publishing Associates, Brooklyn, N. Y.
- 3 Beard, P.M.; Daniels, M.J.; Henderson, D.; Pirie, A.; Rudge, K.; Buxton, D.; Rhind, S.; Greig, A.; Hutchings, M.R.; McKendrick, I.; Stevenson, K.; Sharp, J.M. Paratuberculosis infection of non ruminant wildlife. *Scotland J. clin Microbiol* 2001; 39 (4): 1517-1521
- 4 Belnap, E.B.; Getzy D.M.; Jonson, L.W.; 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 Collins, D.M.; Stephens, D.M.; De Lisle, G.W. Comparison of polymerase chain reaction tests and faecal culture for detecting *Mycobacterium paratuberculosis* in bovine faeces. *Vet Microbiol* 1993; 36 (3-4): 289-99

7. Corner, L.A.L. The role of wild animal populations in the epidemiology of tuberculosis in domestic animals: How to assess the risk. *Vet Microbiol* 2006;112: 303-312
8. 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
9. Cousins, D.V.; Williams, S.N.; Hope, A.; Eamens, G.J. DNA fingerprinting of Australian isolates of *Mycobacterium avium* subspecies paratuberculosis using IS900 RFLP. *Aust Vet J.* 2000; 78(3): 184-190
10. 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
11. Fidanza, I.; Casas, J.C. *En la tierra de la llama*. El Federal 2005; Año 2 (76): 26-37
12. 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
13. Harris, N.B.; Barletta, R.G. *Mycobacterium avium* subspecies paratuberculosis in Veterinary Medicine. *Clin Microbiol Reviews* 2001; 14 (3): 489-512
14. Kramsky, J.A.; Miller, D.S.; 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, D.V.; Mills, A.J.; Van Wijk, J.G.A. Identification of *Mycobacterium avium* subspecies *avium* in an alpaca with lesions resembling paratuberculosis. *Aust Vet J* 2003; 81(9): 567-569
16. 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
17. Organización Mundial de Sanidad Animal. *Manual of diagnostic test and vaccines for terrestrial animals*. Chapter 2. 2. 6. Paratuberculosis Johne's disease. 5th Edition. 2004. En: http://www.oie.int/esp/normes/mmanual/pdf_es/2.2.06_paratuberculosis.pdf
18. Ridge, S.E.; Harkin, J.T.; Barman, R.T.; Mellor, A.M.; Larsen, J.W. Johne's disease in alpacas (*Lama pacos*) in Australia. *Aust Vet J* 1995; 72 (4): 150-153
19. Stehman, S.M. Paratuberculosis in small ruminants, deer, and South American Camelids. *Vet Clin North Am Food Anim Pract* 1996; 12 (2): 441-455
20. Stevens, J.B.; Thoen, C.; Rohoney, E.B.; Tessaro, S.; Kelly, H.A.; Duncan, J.R. The Immunological Response of Llamas (*Lama glama*) Following Experimental Infection with *Mycobacterium bovis*. *Can J Vet Res* 1998; 62: 102-109
21. Telenti, A.; Marchesi, F.; Balz, M.; Bally, F.; Böttger, E.; Bodmer, T. Rapid identification of mycobacteria to the species level by polymerase chain reaction and restriction enzyme analysis. *J Clin Microbiol* 1993; 31:175-178
22. Williams, E.S.; Zinder, S.P.; Martin, K.L. Pathology of Spontaneous and Experimental Infection of North American Wild Ruminants with *Mycobacterium paratuberculosis*. *Vet Pathol* 1983, 20: 274-291