

Nuevas estrategias en la lucha contra la Paratuberculosis

Joseba Garrido Urkullu
Dpto. de Sanidad Animal
Neiker-Derio
jgarrido@neiker.eus



II Foro de Vacuno de Leche. Córdoba 1 y 2 de Octubre de 2015

Esquema de la presentación

- **INTRODUCCIÓN**

- Agente Etiológico
- Epidemiología
- Patogenia

- **DIAGNÓSTICO**

- Clínico Epidemiológico
- Laboratorial

- **CONTROL**

- Mejora del Manejo
- Detección y Eliminación
 - Análisis de resultados
- Vacunación
 - Análisis de resultados



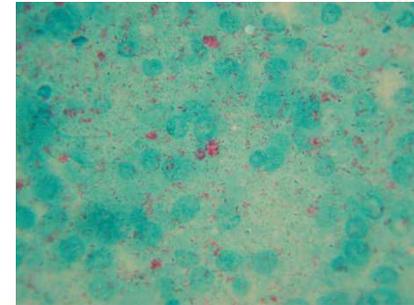
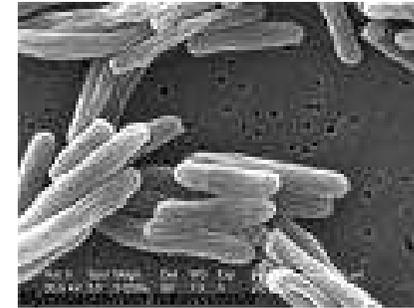
John y Frothingham, 1895

Agente etiológico

Mycobacterium avium subsp. *paratuberculosis*

Aspectos generales

- Bacilos de 1-2 μm de longitud
- Bacilos de 0,5 μm de ancho
- Acido alcohol resistente
- Se presentan en forma de grumos
- Crecimiento lento
- “Dependencia de la micobactina”



Agente etiológico

Resistencia

- Pasto 12 meses
- Heces 13 meses
- Agua 15 meses

Estructura de su pared

**Baja actividad metabólica
(Tiempo de generación 36h)**

Epidemiología

Distribución



Difícil comparación de prevalencias

Especies afectadas



Transmisión

Principal FECAL-ORAL

Un gramo de heces puede contener entre $1,3 \times 10^5$ y $5,9 \times 10^6$ UFC de Map.

Jorgensen, 1982.

Enfermedad de Crohn ¿ZONOSIS?

Síntomas
Lesiones



Map?
Factores Genéticos?

APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY, Sept. 1998, p. 3153-3158
0099-2240/98/\$04.00+0
Copyright © 1998, American Society for Microbiology. All Rights Reserved.

Isolation of *Mycobacterium paratuberculosis* from Milk by Immunomagnetic Separation

IRENE R. GRANT,^{1*} HYWEL J. BALL,² AND MICHAEL T. ROWE¹

FOODBORNE PATHOGENS AND DISEASE
Volume 6, Number 4, 2009
© Mary Ann Liebert, Inc.
DOI: 10.1089/fpd.2008.0226

Isolation of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* from Muscle Tissue of Naturally Infected Cattle

Marta Alonso-Hearn, Elena Molina, Marivi Geijo, Patricia Vazquez, Iker Sevilla,
Joseba M. Garrido, and Ramon A. Juste



Epidemiología



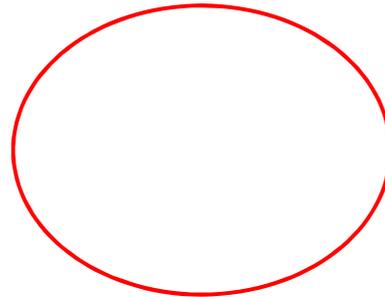
Epidemiología



Epidemiología



Epidemiología



Pérdidas económicas

Pérdidas directas	Pérdidas indirectas
<ul style="list-style-type: none">▪ Muerte / desvieje prematuro de los animales enfermos → Reducción en el valor de desvieje de los animales▪ Empeoramiento de los parámetros productivos: especialmente reducción de la producción láctea (Kg), pero también de aquellos relativos a la calidad, como el incremento de células somáticas▪ Empeoramiento de los índices reproductivos: infertilidad y complicaciones postparto▪ Bajo índice de conversión tanto en animales con signos clínicos como en curso subclínicos.▪ Reducción de la vida productiva▪ Mayor predisposición a otras patologías (enfermedades crónicas: mastitis, ruminitis)	<ul style="list-style-type: none">▪ Producciones no realizadas en animales sacrificados prematuramente▪ Incremento en el gasto asociado a la cría de animales hasta que alcancen la vida productiva▪ Incremento de gasto asociado a la reposición (compra de animales jóvenes)▪ Gastos en diagnóstico y tratamiento de las diarreas▪ Gastos destinados al control de la infección▪ Otros: Pérdida de animales de alto valor genético, restricciones de mercado, mala reputación de la explotación...

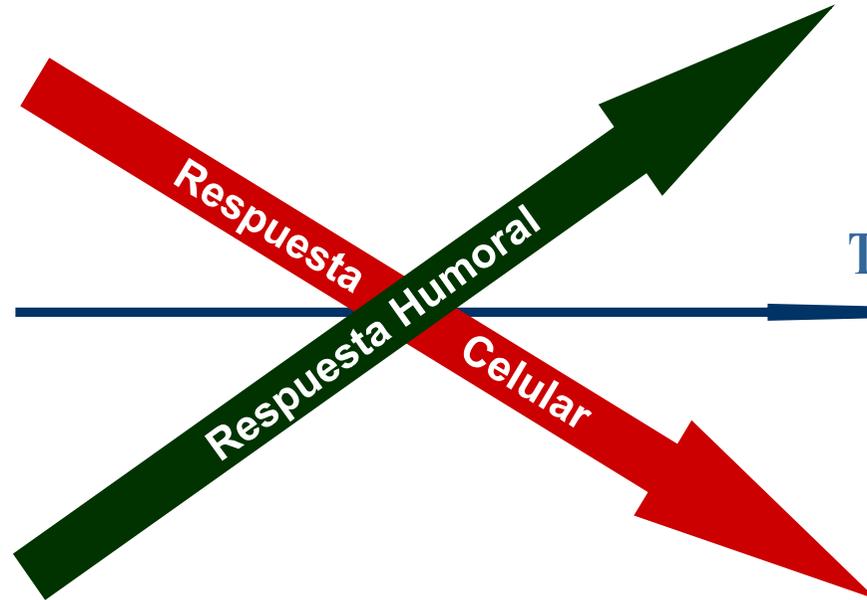
Espectro Inmunopatológico

Patogenia

CARGA BACTERIANA

Baja

Alta



Tiempo



Focales / Multifocales

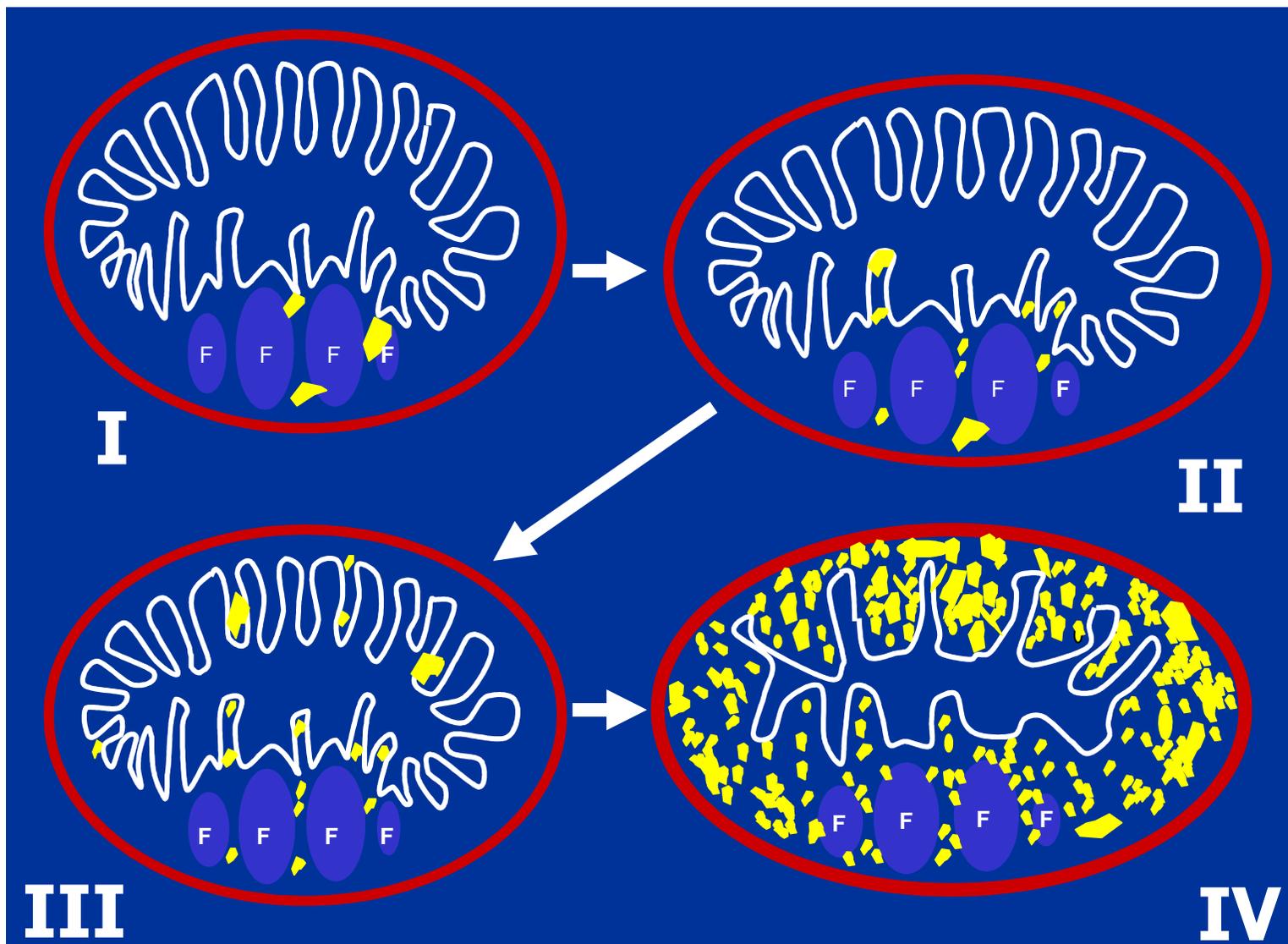
Difusas



TIPO LESIONAL

Formas lesionales

Patogenia



Diagnóstico

✓ Clínico - Epidemiológico

I Subclínica

Sin síntomas evidentes

II Clínica

Disminución de la producción

Pelo áspero

Pérdida de peso

Diarrea

- Vacas de 1^{er} y 2^o parto
- Primeras semanas tras el parto
- Presentación en forma de goteo a lo largo del año

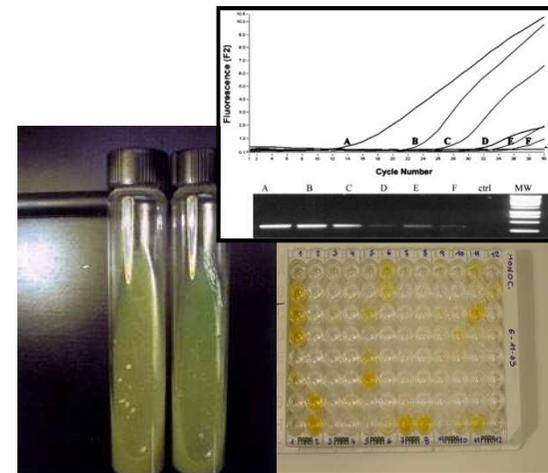


Diagnóstico

✓ Laboratorial

TIPOS DE ENSAYOS

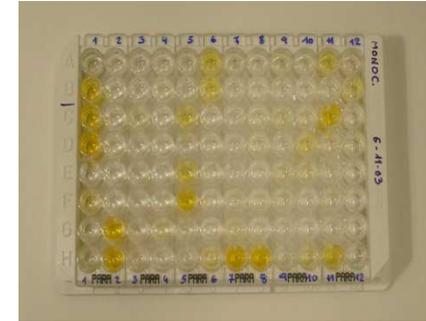
- Inmunológicos
- Microbiológicos
- Moleculares
- Anatomopatológicos



Diagnóstico Inmunológico

ELISA

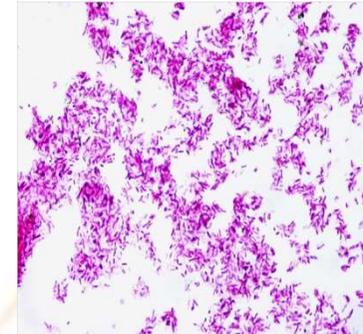
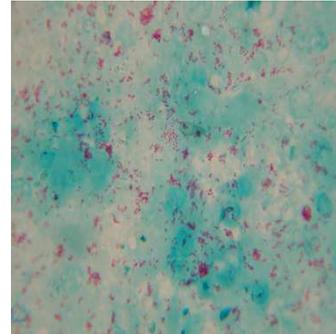
- Especificidad prox. 100%
- Detec. Prec. No eliminadores 25%
- Prec. Eliminadores 66%
- Casos clínicos 90%
- Diferentes antígenos



Antígenos de MAP con valor diagnóstico	Descripción	Aplicación diagnóstica	Referencias
Johnina o PPDj	Extracto proteico purificado	IFN- γ	Johnson, 1944
Lipoarabinomanano o LAM	Componente de la pared celular	ELISA	Sugden et al., 1997
Antígeno proteoplasmático o PPA-3	Antígeno proteoplasmático crudo (cepa 18 de <i>M. avium</i>)	ELISA	Bech-Nielsen et al., 1985; Pérez et al., 1997
Proteínas de choque térmico (Heat-shock proteins)	Se clasifican en tres grandes grupos: Dnak, GroES y GroEL	ELISA	Koets et al., 1999
Proteínas según tamaño	15 kilodaltons (kD), 34 kD, 35 kD, etc.	IFN- γ ELISA	Stevenson et al., 1992; Burrells et al., 1995; Bannantine et al., 2003; Willemsen et al., 2006

IDENTIFICACIÓN MICROSCÓPICA

- Tinción de Ziehl-Neelsen
- 400.000 micobacterias / gr heces
- Detección en CC-SC: 30%
- Rápida, sencilla y barata
- Subjetiva y no automatizable



Diagnóstico Microbiológico



Decontaminación

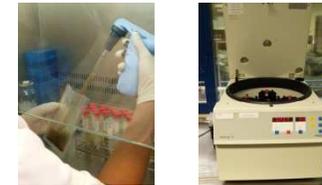


Cloruro de benzalconio
Hexadecil piridinio
Ácido oxálico
NaOH

Enriquecimiento



Sedimentación
Centrifugación



Cultivo

- Huevo

Herrold
Löwenstein-Jensen

- Suero

Dubos

- Sintéticos

Middlebrook 7H9, 7H11
Watson Reid

Enriquecimientos

Micobactina J
OADC
Piruvato

- Detección automática

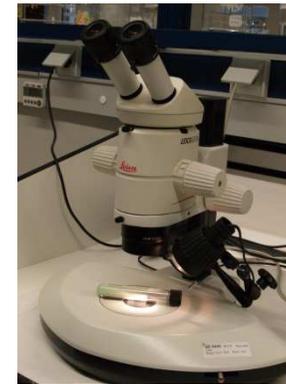
Radiométricos: ¹⁴C
No Radiométricos

AISLAMIENTO

Diagnóstico Microbiológico

AISLAMIENTO

- ✓ **Técnica de referencia**
- ✓ Revisiones mensuales en lupa
- ✓ Límite de detección 50-100 m/g heces
- ✓ Especificidad del 100%
- ✓ En infecciones subclínicas 40-60%
- ✓ Lenta, cara y no automatizable
- ✓ **Actualmente no es una técnica de rutina**



Tipado de cepas: PCR REA IS1311

Origen	Hospedador	Mycobacteria sp	Medio	Nº Aislam.	IS900 PCR	IS1311 PCR-REA
España	Bovino	<i>Map</i>	HEYM	346	+	C
	Ovino	<i>Map</i>	7H11 / L-J	11	+	S
	Ovino	<i>Map</i>	7H11 / L-J	1	+	C
	Caprino	<i>Map</i>	7H11 / L-J	6	+	S
	Caprino	<i>Map</i>	7H11 / L-J	4	+	C
	Bovino	<i>Maa</i>	Coletsos	1	Neg	Patrón <i>Maa</i>
	Caprino	<i>Maa</i>	Coletsos	1	Neg	Patrón <i>Maa</i>
	Tejón	<i>M. intracellulare</i>	Coletsos	1	Neg	275 + 245 bp
	Bovino	<i>M. bovis</i>	Coletsos	1	Neg	Neg PCR
	Bovino	<i>M. chelonae</i>	Coletsos	1	Neg	Neg PCR
	Caprino	<i>M. bovis</i>	Coletsos	1	Neg	Neg PCR
India	Caprino	<i>Map</i>	HEYM	6	+	B
	Ovino	<i>Map</i>	HEYM	5	+	B
	Ovino	<i>M. asiaticum</i>	HEYM	1	Neg	PCR Neg
USA	Bison	<i>Map</i>	L-J	3	+	B
	Bison	<i>Maa</i>	7H9	1	Neg	Patrón <i>Maa</i>

Rev. sci. tech. Off. int. Epiz., 2005, 24 (3), 1061-1066

Molecular typing of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* strains from different hosts and regions

n

I. Sevilla¹, S.V. Singh², J.M. Garrido¹, G. Aduriz¹, S. Rodríguez³, M.V. Geijo¹, R.J. Whittington⁴, V. Saunders⁵, R.H. Whitlock⁶ & R.A. Juste¹

DEPARTAMENTO DE DESARROLLO ECONÓMICO Y EMPLEO

BMC Microbiology



Research article

Open Access

Pulsed-field gel electrophoresis profile homogeneity of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* isolates from cattle and heterogeneity of those from sheep and goats

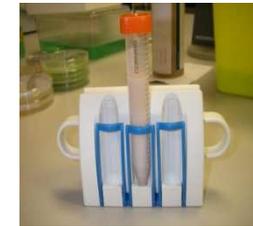
Iker Sevilla, Joseba M Garrido, Marivi Geijo and Ramon A Juste*

Diagnóstico Molecular

PCR

Concentración

- Sedimentación
- Centrifugación
- Separación IM



Extracción del DNA

- Físicos
- Químicos
- Enzimáticos

Amplificación

- PCR convencional
- PCR a tiempo real
- PCR anidada

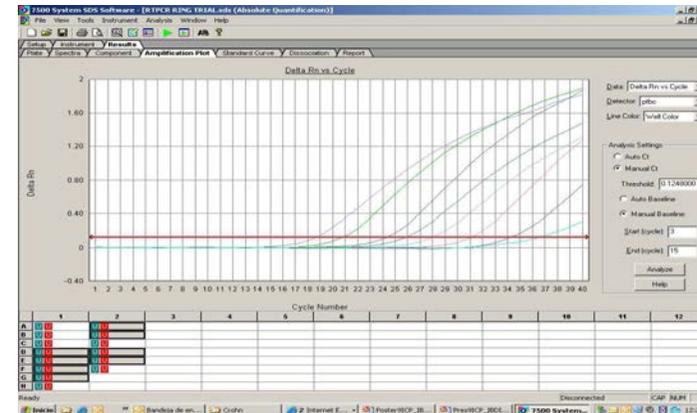


Diagnóstico Molecular

PCR

Aspectos positivos

- Límite de detección 50-100 m/g heces
- Especificidad absoluta
- Técnica rápida
- Automatización de las extracciones



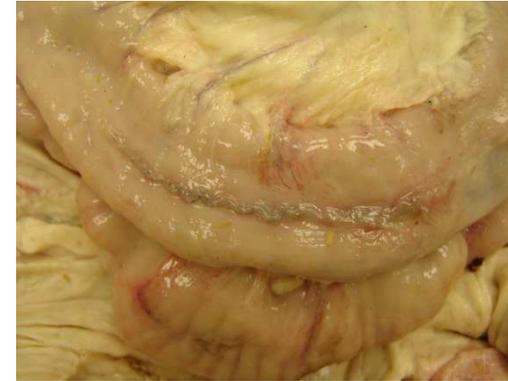
Diagnóstico Anatomopatológico



Poca grasa
NL Reactivos



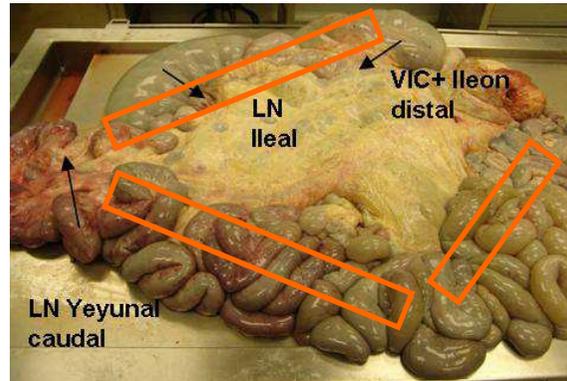
Linfangiectasia



Tubo de goma
Linfangiectasia



Pliegues en la mucosa



Zonas de elección



Placa de Peyer

Diagnóstico

Comparación de Técnicas

ELISA / PCR

RTPCR	ELISA			Total
	Positivo	Negativo	Dudoso	
Negativo	3,5% 159	4004	14	4177
Positivo	161	3,7% 166	4	331
Total	320	4170	18	4508

Diagnóstico

Comparación de Técnicas

Estimación de la Prevalencia

Serie: Todas las técnicas positivas

Paralelo: Al menos una de las técnicas es positiva

Muestreo al azar en matadero

n = 1031 animales

Raza Frisona

	ELISA	CULTIVO	rtPCR	HP	SERIE	PARALELO
Muestras Positivas(n)	76	158	305	460	58	604
Muestras Positivas(%)	7,4	15,0	29,6	46,6	5,6	58,6

FOCALES
83,5%

MULTIFOCALES
7,4%

DIFUSAS
9,1%

Diagnóstico

¿Qué muestras debemos solicitar?

Animal vivo

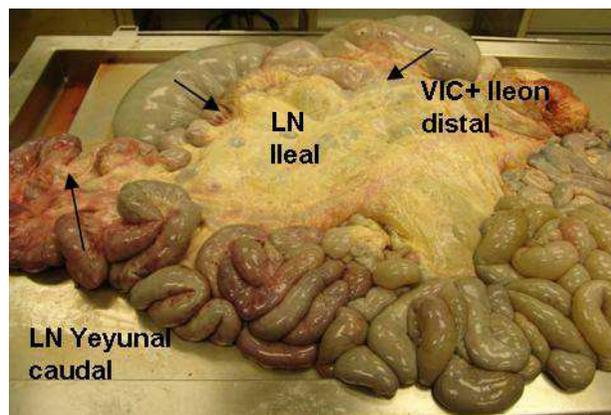
Suero: ELISA

Heces: PCR / Cultivo

Animal muerto

Tejidos: Cultivo / PCR; HP (HE / ZN)

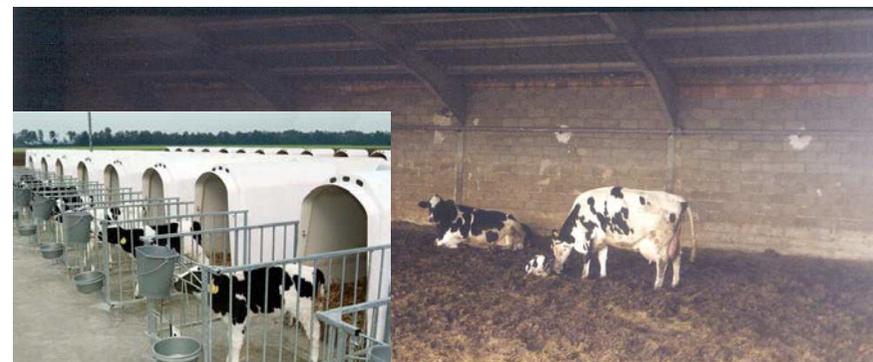
En formol



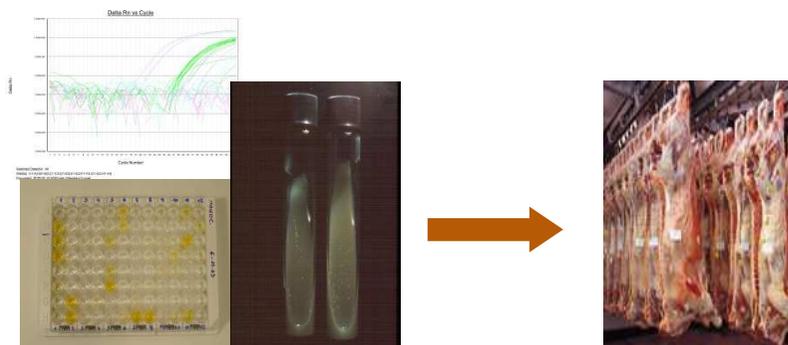
Refrigerados

Control

- Mejora del manejo



- Detección y eliminación



- Vacunación



Terneros

- Zona de partos limpia y aislada
- Separación inmediata del ternero
- No emplear el calostro de vacas sospechosas
- Aislamiento de los animales de reposición (12 m)
- No permitir el contacto con heces o purines de animales adultos: Nave / Pastos
- Manejo diario de los terneros previo al de adultos
- Limpieza cuidadosa de botas y material común
- Centros de cría



Adultos

- Aislamiento de los sospechosos en áreas de fácil limpieza
- Confirmación laboratorial de los sospechosos
- Prevenir la contaminación fecal de agua y alimentos
- Comprar animales de explotaciones sin historial de paratuberculosis



Control Mejora del manejo

- Duplicidad de instalaciones
- Inviabile en explotaciones pequeñas
- No aplicable en explotaciones de ganado de carne
- Los resultados se hacen esperar
- El ganadero se desanima y abandona



RESISTENCIA / SUSCEPTIBILIDAD



J. Dairy Sci. 93:5950–5958
doi:10.3168/jds.2010-3340
© American Dairy Science Association®, 2010.

SP110 as a novel susceptibility gene for *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* infection in cattle

O. Ruiz-Larrañaga,* J. M. Garrido,† M. Iriondo,* C. Manzano,* E. Molina,† I. Montes,* P. Vazquez,†
A. P. Koets,‡ V. P. M. G. Rutten,§# R. A. Juste,† and A. Estonba*¹

ANIMAL GENETICS

Immunogenetics, Molecular Genetics
and Functional Genomics



SHORT COMMUNICATION

doi:10.1111/j.1365-2052.2010.02055.x

Genetic association between bovine *NOD2* polymorphisms and infection by *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in Holstein-Friesian cattle

O. Ruiz-Larrañaga*, J. M. Garrido[†], M. Iriondo*, C. Manzano*, E. Molina[†], A. P. Koets[‡],
V. P. M. G. Rutten^{§,¶}, R. A. Juste[†] and A. Estonba*¹



J. Dairy Sci. 93:1713–1721
doi:10.3168/jds.2009-2438
© American Dairy Science Association®, 2010.

Identification of single nucleotide polymorphisms in the bovine solute carrier family 11 member 1 (*SLC11A1*) gene and their association with infection by *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis*

O. Ruiz-Larrañaga,* J. M. Garrido,† C. Manzano,* M. Iriondo,* E. Molina,† A. Gil,* A. P. Koets,‡
V. P. M. G. Rutten,§# R. A. Juste,† and A. Estonba*¹



J. Dairy Sci. 94:3635–3641
doi:10.3168/jds.2010-3788
© American Dairy Science Association®, 2011.

Genetic variation of toll-like receptor genes and infection by *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* in Holstein-Friesian cattle

O. Ruiz-Larrañaga,* C. Manzano,* M. Iriondo,* J. M. Garrido,† E. Molina,† P. Vazquez,† R. A. Juste,†
and A. Estonba*¹

Control Detección y eliminación

- Cultivo de heces

- **PCR de heces**

- **ELISA**

Supereliminadores

< Coste / > Repeticiones

Reducción rápida de casos clínicos

Amplio nº de animales sin detectar

Alto coste económico

Reducción de casos clínicos

Alta tasa de reposición

Confirmación en heces

Animales mayores de 24 meses



PROGRAMAS NACIONALES VOLUNTARIOS

- **Estados Unidos**

Erradicación
Eliminadores / Grandes eliminadores

- **Holanda**

Erradicación → Reducción de Map en leche

- **Dinamarca**

ELISA de leche y producción

Protocolo de trabajo

Explotaciones libres de Tuberculosis

Muestras anuales

Heces: PCR, cultivo

Sangre: ELISA, **IFN**

Intradermorreacción comparativa

IDR Comparada

PPD bovina / PPD aviar (CZ Veterinaria)

Veterinarios Oficiales de Campañas

EU Council Directive 64/432/CEE

Vacunación

- Silirum® (CZ Veterinaria, Spain)
- 1 ml subcutáneo en el pecho
- Todo el grupo
- Reposición >2 meses



Control Resultados



**26 Explotaciones
2006-2012
Libres de Tuberculosis**

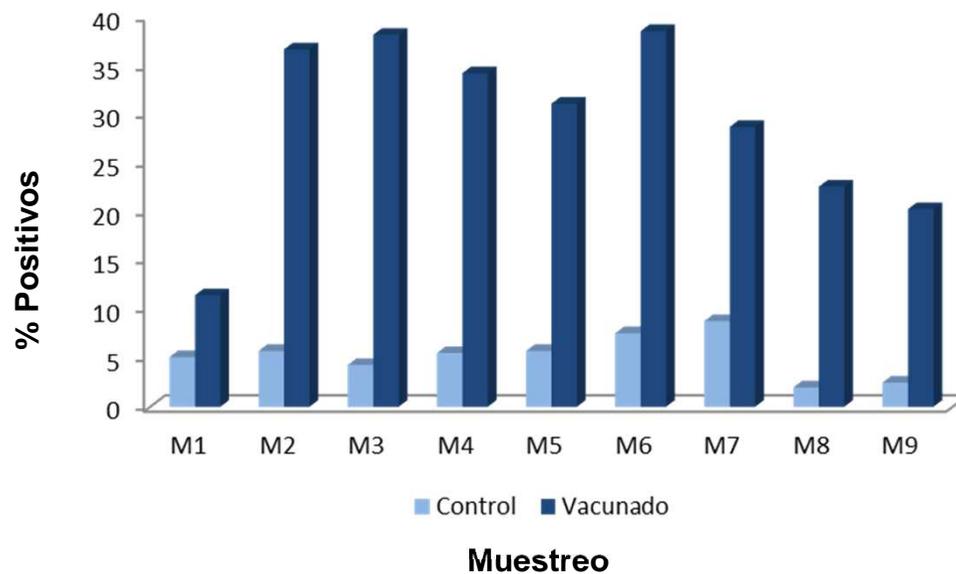
**5 explotaciones control
5.000 registros**

**21 explotaciones vacunadas
10.000 registros**



Evolución de la tasa de anticuerpos

ELISA



Evolución de la excreción fecal

PCR

BMC Research Notes

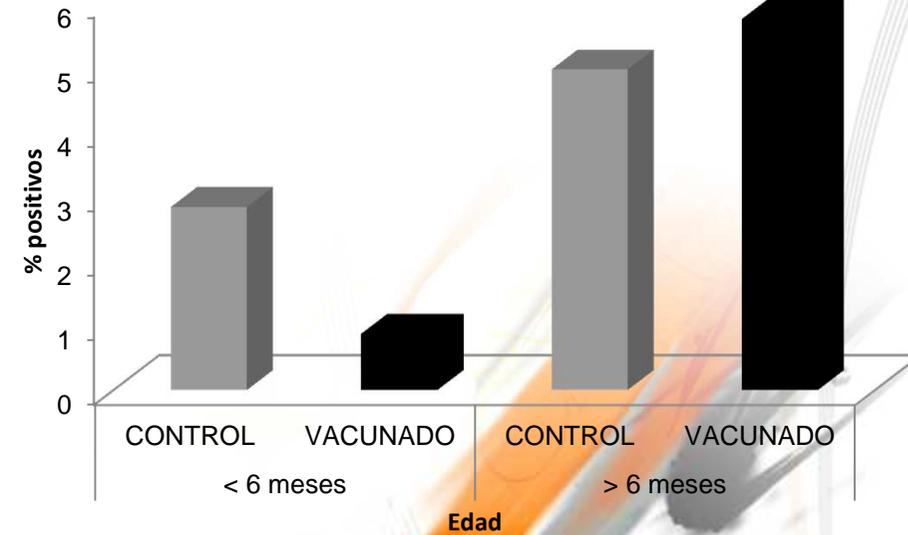
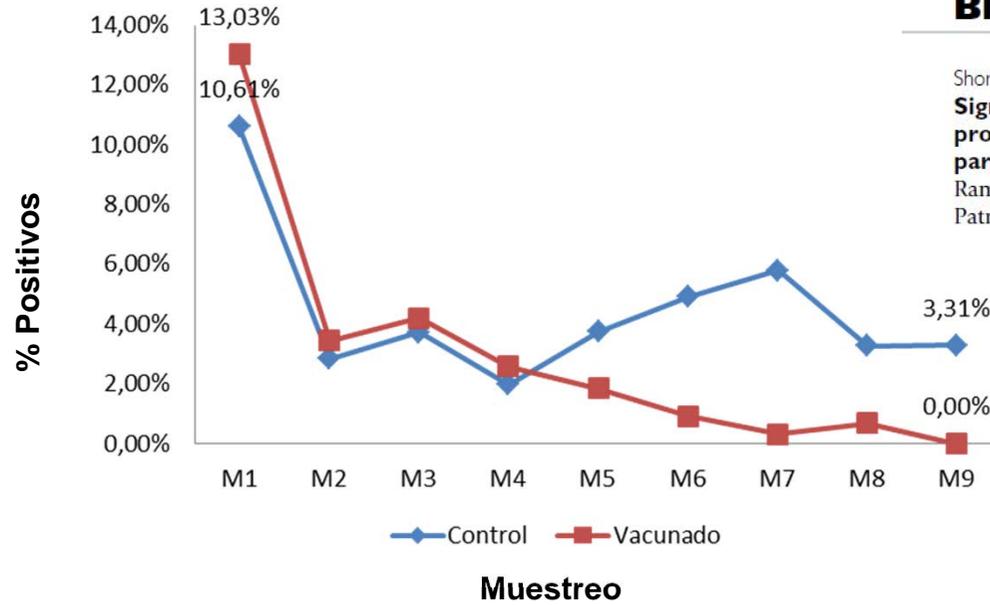


Short Report

[Open Access](#)

Significant reduction in bacterial shedding and improvement in milk production in dairy farms after the use of a new inactivated paratuberculosis vaccine in a field trial

Ramon A Juste*, Marta Alonso-Hearn, Elena Molina, Marivi Geijo, Patricia Vazquez, Iker A Sevilla and Joseba M Garrido



Short Report

Open Access

Significant reduction in bacterial shedding and improvement in milk production in dairy farms after the use of a new inactivated paratuberculosis vaccine in a field trial

Ramon A Juste*, Marta Alonso-Hearn, Elena Molina, Marivi Geijo, Patricia Vazquez, Iker A Sevilla and Joseba M Garrido

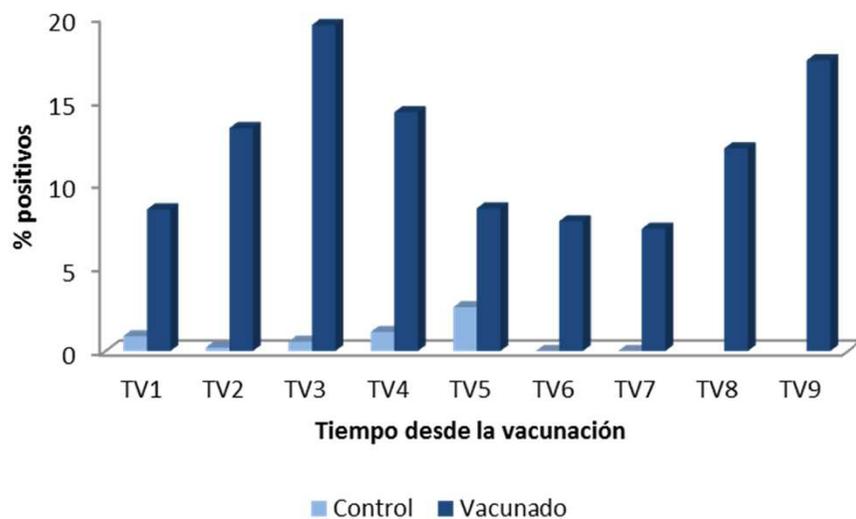
Efecto sobre la producción de leche

Dependent variable	Strategy	Vaccination	No. of records	Marginal mean (kg)	Difference	P
Standard lactation	T&C	Ante-Intervention	1040	10374.96	-186.87	0.2318
		Post-Intervention	242	10288.09	(1.80%)	
	VAC	Ante-Intervention	767	9420.51	257.13	0.0379
		Post-Intervention	364	9677.64	(2.73%)	
Average daily production	T&C	Ante-Intervention	1040	31.55	-0.21	0.7486
		Post-Intervention	232	31.34	(0.67%)	
	VAC	Ante-Intervention	767	29.27	1.15	0.0016
		Post-Intervention	364	30.42	(3.92%)	

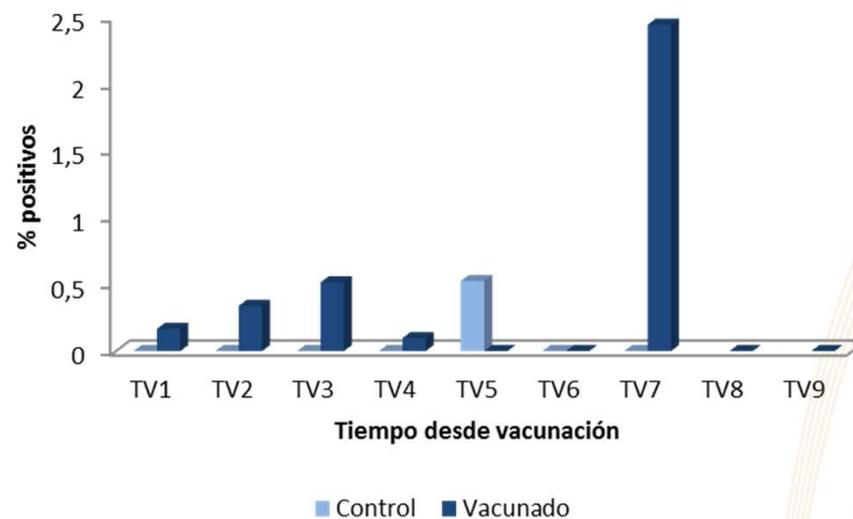
* First sampling date was set as the ante/post-vaccination threshold.

Interferencia con el diagnóstico de la TB

IDR Simple

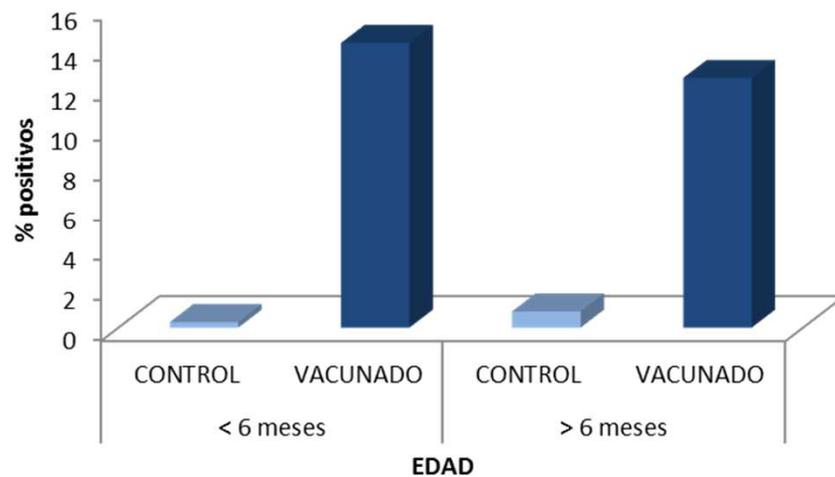


IDR Comparada

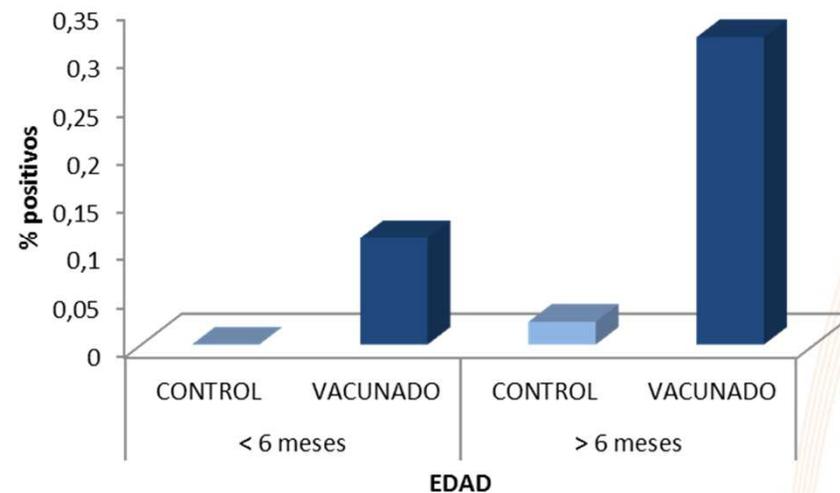


Interferencia con el diagnóstico de la TB

IDR Simple



IDR Comparada



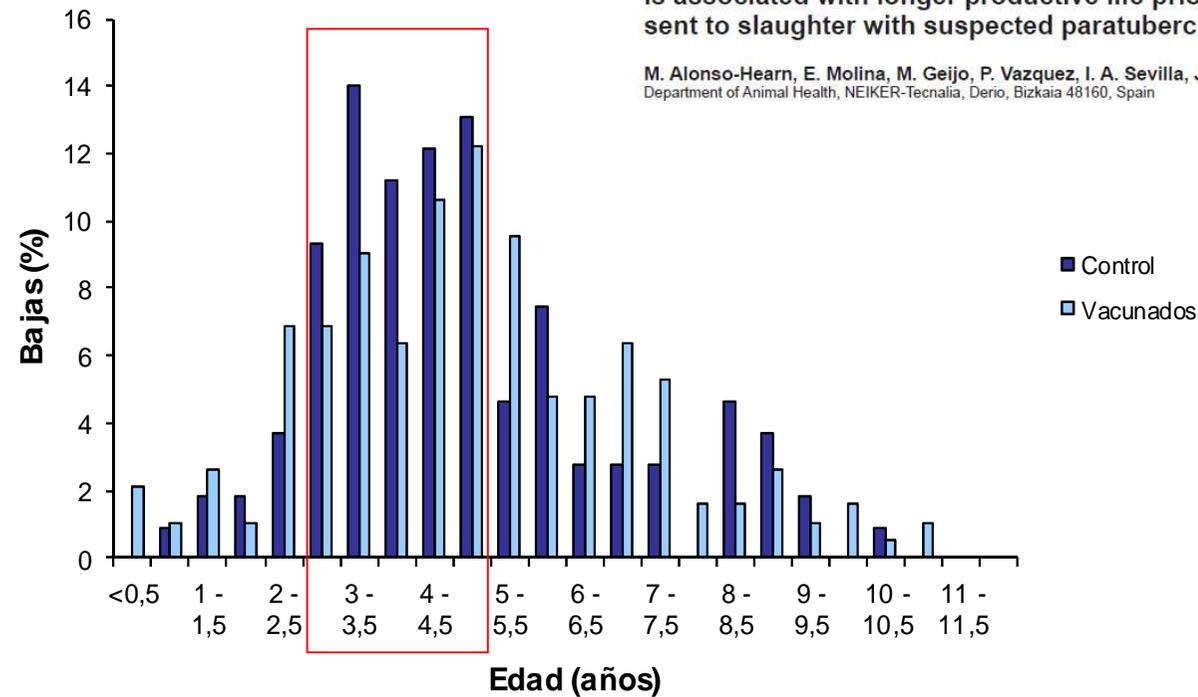
Efecto sobre la edad de desvieje



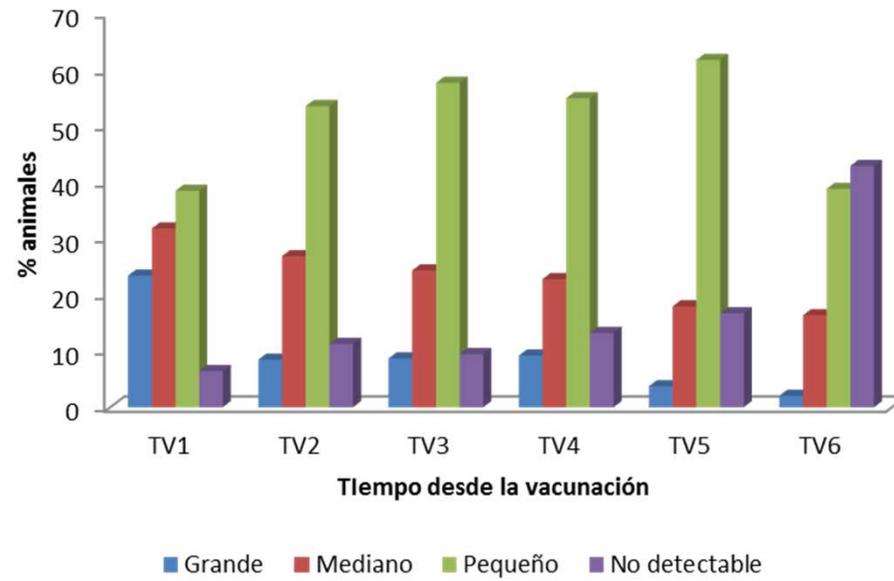
J. Dairy Sci. 95:618–629
doi:10.3168/jds.2009-2860
© American Dairy Science Association®, 2012.

Immunization of adult dairy cattle with a new heat-killed vaccine is associated with longer productive life prior to cows being sent to slaughter with suspected paratuberculosis

M. Alonso-Hearn, E. Molina, M. Geijo, P. Vazquez, I. A. Sevilla, J. M. Garrido, and R. A. Juste¹
Department of Animal Health, NEIKER-Tecnalia, Derio, Bizkaia 48160, Spain



Tamaño de los nódulos vacunales



Efecto sobre las formas lesionales

	Latente			Patente		
	No PTBC	Focal	Multifocal	Difusa		
				Paubacilar	Intermedia	Multibacilar
Vacunados (n=99)	40,40%	19,19%	8,08%	3,03%	9,09%	20,20%
Control (n=67)	40,30%	8,95%	5,97%	5,97%	13,43%	25,37%



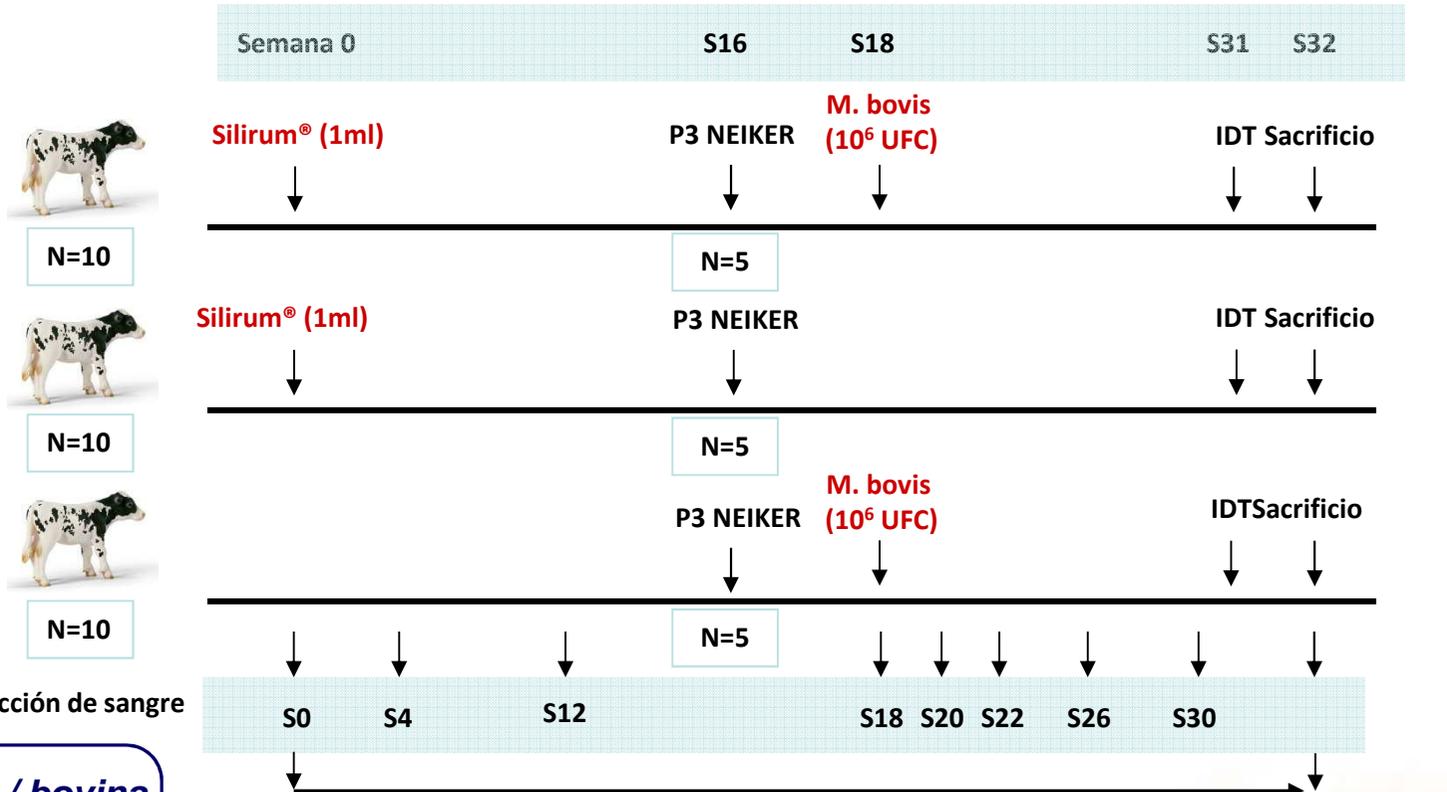
Control

Conclusiones

- Manejo de la recría
- Detección de eliminadores
- Vacunación? Priorizar la erradicación de la TB

Materiales y métodos

Infección experimental



- ✓ PPD aviar / bovina
- ✓ ESAT-6 y CFP10
- ✓ Rv3615c

IFN-γ
Anticuerpos



Patología
Bacteriología

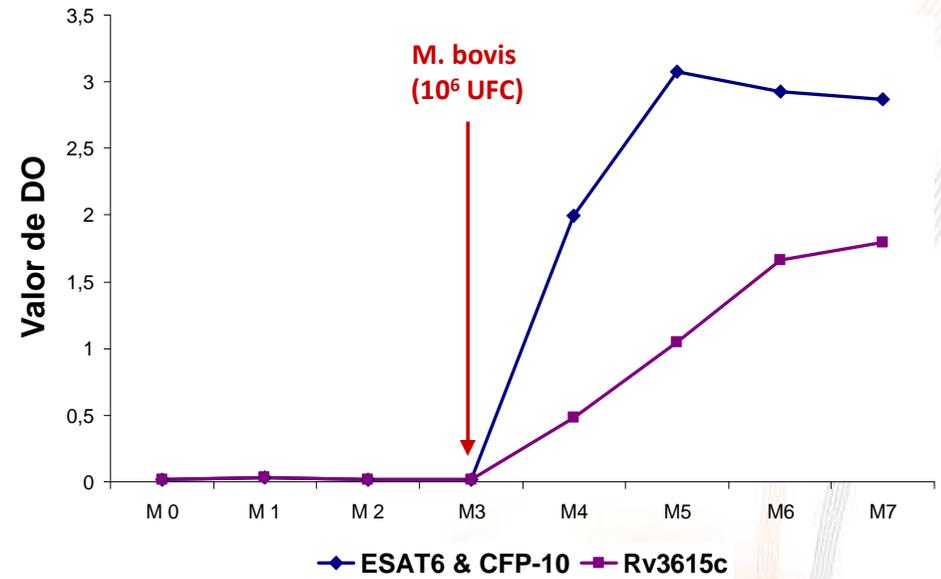
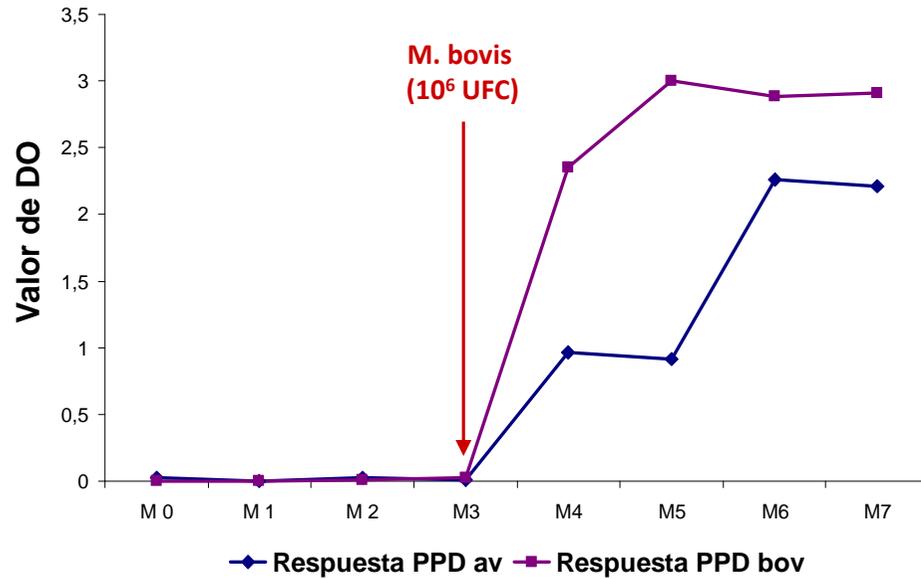


Resultados

Infección experimental

Cuantificación IFN gamma

Grupo No Vac PTB / Infectado *M. bovis*

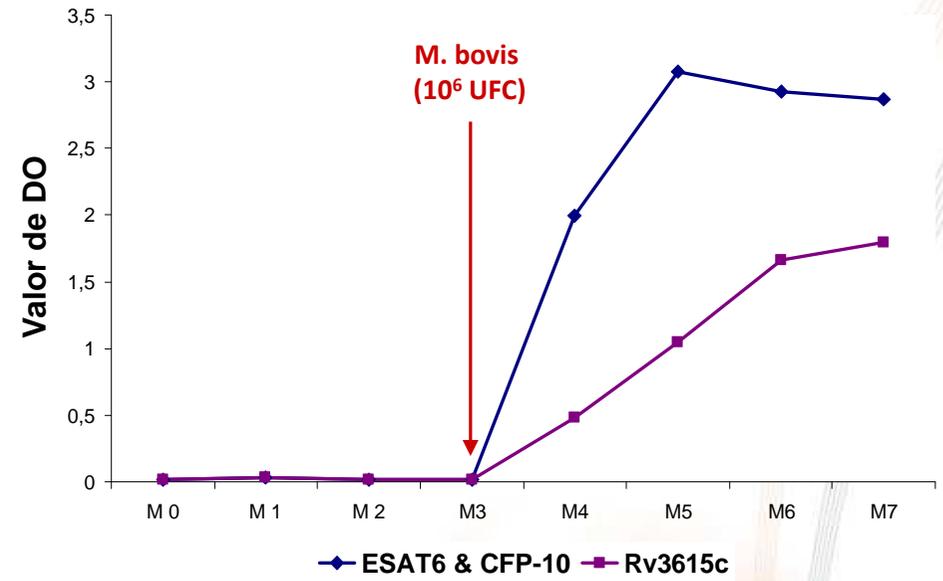
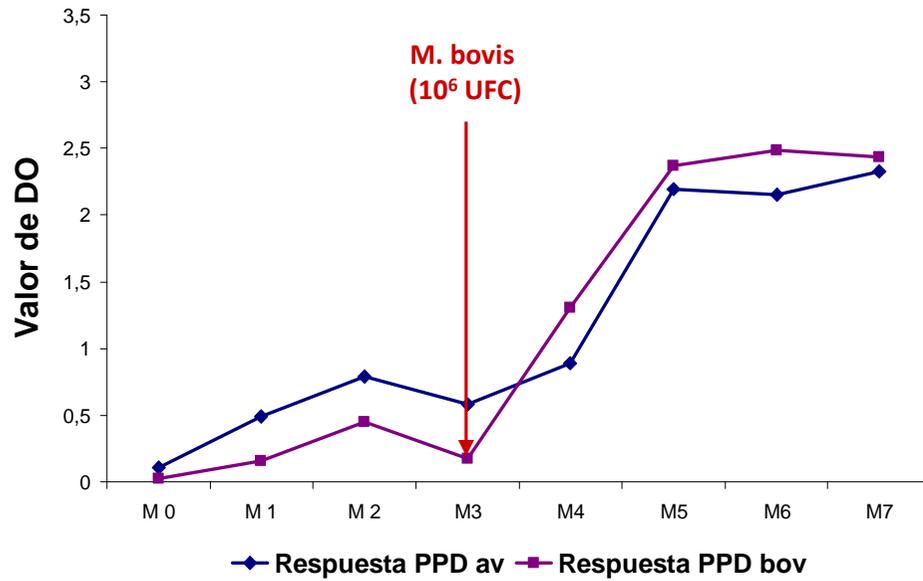


Resultados

Infección experimental

Cuantificación IFN gamma

Grupo Vac PTB / Infectado *M. bovis*



Resultados

Infección experimental

Resultados IDR terneros

		PPD AVIAR			PPD BOVINA			PEPTIDE COCKTAIL			PROTEIN COCKTAIL		
		PRE	POST	DIF	PRE	POST	DIF	PRE	POST	DIF	PRE	POST	DIF
ES000306871045	NoVac I	6	8	2	5	14	9	6	11	5	5	11	6
ES061109501049	NoVac I	8	9	1	6	14	8	6	14	8	6	12	6
ES040306857732	NoVac I	8	9	1	7	19	12	5	14	9	8	15	7
ES020306872346	NoVac I	11	11	0	8	17	9	11	14	3	8	11	3
ES041109435455	NoVac I	6	7	1	8	13	5	10	14	4	7	13	6
ES030604109245	Vac I	6	15	9	6	15	9	7	10	3	7	12	5
ES070306871199	Vac I	5	12	7	4	10	6	5	11	6	4	8	4
ES080809514303	Vac I	11	23	12	6	29	23	11	22	11	9	24	15
ES091109289634	Vac I	8	19	11	6	16	10	8	14	6	6	9	3
ES051108405492	Vac I	8	16	8	6	24	18	7	14	7	6	13	7
ES020810027580	Vac Nol	10	22	12	8	13	5	10	10	0	9	9	0
ES090810032268	Vac Nol	10	24	14	9	14	5	10	13	3	9	9	0
ES030306864770	Vac Nol	6	15	9	5	8	3	6	7	1	5	5	0
ES080306864775	Vac Nol	6	12	6	5	9	4	6	6	0	5	5	0
ES040809184716	Vac Nol	6	14	8	5	8	3	7	7	0	6	6	0

¿LA PEOR ESTRATEGIA DE CONTROL DE LA PARATUBERCULOSIS?



No hacer nada

Agradecimientos

- Grupo de micobacterias de Neiker
- Servicios de Ganadería de la DDFF
- Veterinarios Clínicos de las explotaciones
- Federación Frisona de Euskadi (EFRIFE)
- Servicios Vet. Mataderos de Bilbao, Donostia y Zestoa
- Financiadores: UE, MINECO, INIA, DECO-GV

Muchas Gracias!!!