

PCR PARA VIGILANCIA EPIDEMIOLÓGICA

Tuberculosis Bovina



bajo control

Gracias a esta nueva técnica desarrollada por el INTA y el Ministerio de Producción santafesino, el Estado ahora tiene una herramienta más para mantener a raya a la TBB. Otras provincias podrían acceder a esta técnica aplicada en tambos.

Por Felicitas Terreno



Por año se pierden cerca de **63 millones de dólares** en la Argentina a causa de la Tuberculosis Bovina (TBB), una enfermedad que afecta al 0,6 por ciento de esos animales. Esa cantidad de dinero se calcula en base a la pérdida de peso en los bovinos (36 por ciento), las pérdidas en producción de leche (13 por ciento del total) y el decomiso en mataderos y mataderos (10 por ciento)*. Por este motivo no es raro pensar que esta enfermedad zoonótica repercute fuertemente tanto en la **economía** de una determinada región como en sus sistemas de **Salud Pública**.

Según la Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE, por sus siglas en inglés), se trata de una enfermedad crónica de los animales que ocasiona un deterioro de su estado general de salud y puede afectar prácticamente a **todos los mamíferos**, incluido al ser humano. Hasta los años 20, cuando se comenzaron a aplicar medidas de control, era una de las principales enfermedades de los animales domésticos.

El coordinador del área de biotecnología pecuaria del Instituto de Biotecnología del INTA Castelar, Ángel Cataldi, asegura que en la Argentina, la TBB “tiene una prevalencia bastante importante, aunque en franco descenso” ya

que “entre el tres y el cinco por ciento de los bovinos estarían infectados”.

Por ello es que el SENASA, en su resolución 128/2012, presentó un nuevo **plan de control y erradicación de la Tuberculosis Bovina** para “la totalidad de los tambos y cabañas de leche de bovinos, caprinos y ovinos, y las cabañas de carne de bovinos y caprinos” del país. Básicamente, este plan consiste en la realización periódica de la **prueba tuberculínica**, (considerada como el “procedimiento básico de diagnóstico para reconocer a los animales infectados en el rodeo”) y la eliminación a faena de los reaccionantes positivos.

PCR para vigilancia regional

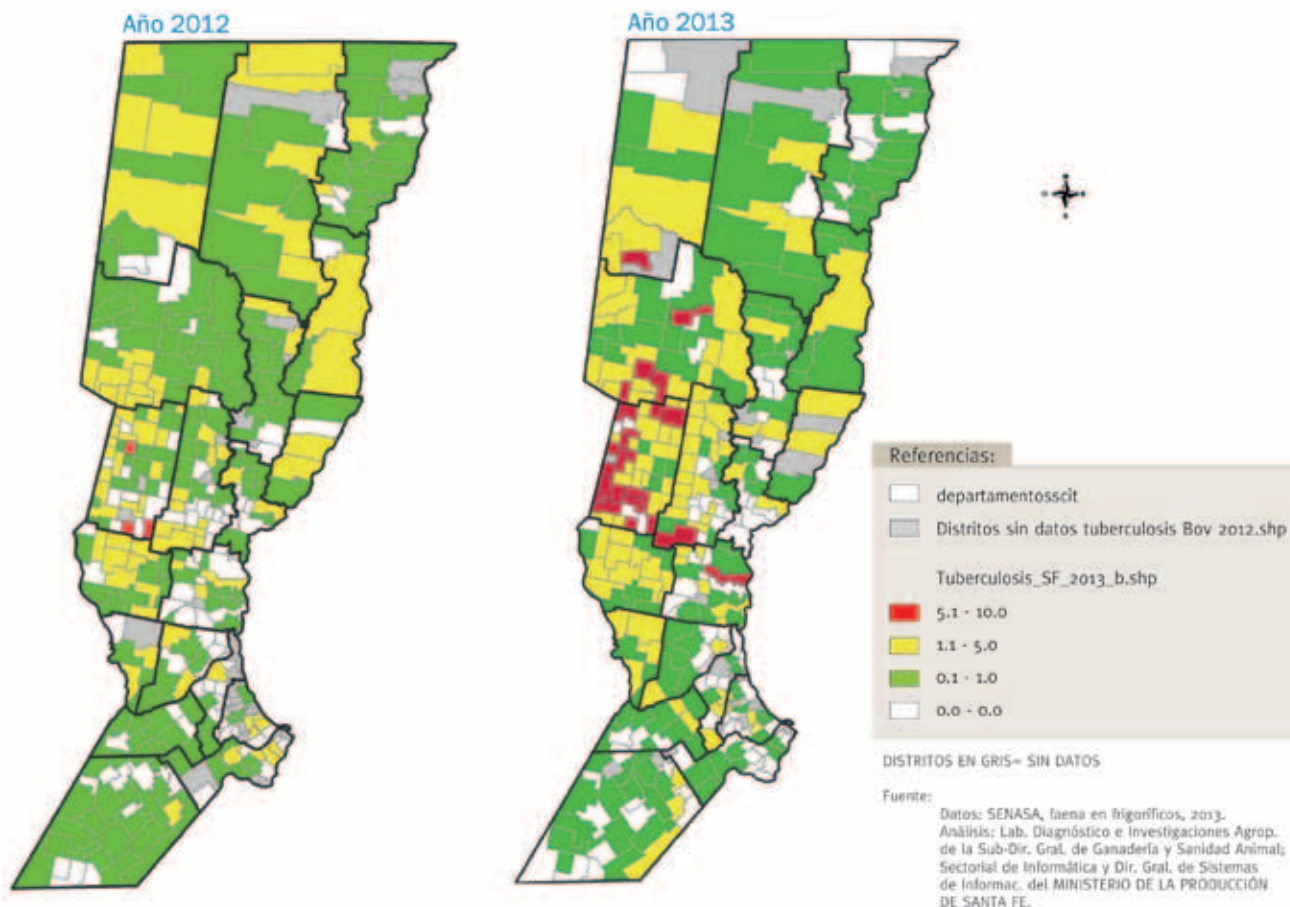
No obstante, además de este test, el organismo de control recomienda aplicar programas regionales que utilicen algún tipo de **sistema de vigilancia epidemiológica** que se sume a los controles que ya se realizan obligatoriamente en mataderos y frigoríficos.

En este sentido, el INTA y el Ministerio de la Producción de la provincia de Santa Fe desarrollaron una metodología para **determinar la presencia de bacilos de TBB** en leche vacuna para ser aplicado en tambos.

* Nader, A.; Husberg, H. (1988). Estimación de pérdidas de producción por tuberculosis bovina en rodeos lecheros. Rev Arg Med Vet. 69 (1): 36-43.

Provincia de Santa Fe

Prevalencia de Tuberculosis bovina en órganos decomisados en frigoríficos de la provincia de Santa Fe.



Según recuerda Cataldi, “nos reunimos con compañeros del INTA Rafaela y de la Dirección de Sanidad Animal del Ministerio para ver si podíamos poner a punto algún método por el cual se haga un **screening** de TBB mediante muestras de leche de tanque de un tambo para tener una idea de todo el rodeo.”

Así, uno de los investigadores del Instituto de Biotecnología del INTA Castelar, Martín Zumárraga, recuerda que “la puesta a punto del método fue una larga tarea”.

Es que la leche, por su composición, constituye una muestra compleja que requiere de un tratamiento especial para poder ser analizada por métodos moleculares. “Para detectar *Mycobacterium bovis* con un método rápido, sensible y específico, **se evaluaron distintos protocolos** entre los que se encontraba la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés)”, señala el inves-

tigador que trabaja bajo la dirección de Cataldi.

Por su parte, la jefa de la división Inmunología del laboratorio de Diagnóstico e Investigaciones Agropecuarias del Ministerio, Adriana Soutullo, comenta que la aplicación de esta técnica era “un desafío” ya que “sabíamos que *M. bovis* estaba en muy pocas cantidades en la leche”. No obstante, también sabían que “la PCR es una **fotocopiadora biológica**, por lo tanto, en bajas cantidades uno puede detectar igual al microorganismo”.

Inicialmente, el equipo estudió leche cruda contaminada artificialmente con bacilos de una cepa de *M. bovis* y, a partir de distintas innovaciones a los protocolos existentes, lograron **detectar hasta tres unidades formadoras de colonias**. Luego se realizó la evaluación del método en muestras individuales de leche de vaca “y, como se obtuvieron resultados alentadores, surgió la idea de su aplicación en le-



TBB: HECHOS CLAVE

- En 1881 Robert Koch descubrió que el bacilo alojado en los tubérculos era el causante de la tuberculosis y, en 1898, fue descrita la bacteria *M. bovis*.
- La pasteurización de la leche procedente de animales infectados acabó en gran medida con la propagación de la tuberculosis bovina en las poblaciones humanas.
- La campaña para eliminar la TBB supuso un gran incentivo para la creación y el desarrollo de los servicios veterinarios de muchos países.
- Aunque en la mayoría de los países desarrollados la enfermedad está bajo control, la persistencia de la infección en animales salvajes complica el objetivo de lograr su completa eliminación.
- En muchos países en desarrollo, la TBB aún representa un grave problema para la salud de personas y animales.

(Fuente: Fichas de información general sobre enfermedades animales -TBB-OIE).

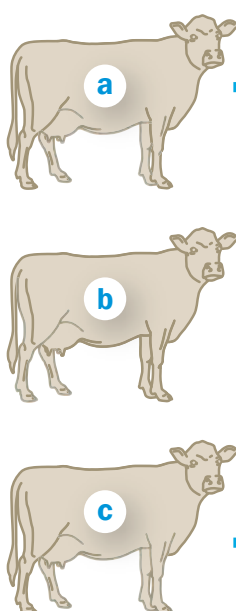
**SE NECESITA
EL COMPROMISO
DE TODOS PARA EVITAR
LA EXPANSIÓN DE LA TBB
A ZONAS NO AFECTADAS
O EN RECUPERACIÓN.**

DetECCIÓN DE TUBERCULOSIS BOVINA CON ANÁLISIS DE ADN EN LECHE

1

TOMA DE MUESTRAS

Se toman muestras de leche en el tambor. Se identifica cada muestra con el ejemplar de origen de la leche colectada.



La leche contiene ADN de distintos orígenes: de la vaca, de bacterias lácticas, de microorganismos en general, etc.



OBJETIVO DEL TEST

Verificar con certeza si la muestra contiene ADN de *Mycobacterium bovis*, la bacteria que causa la tuberculosis bovina.

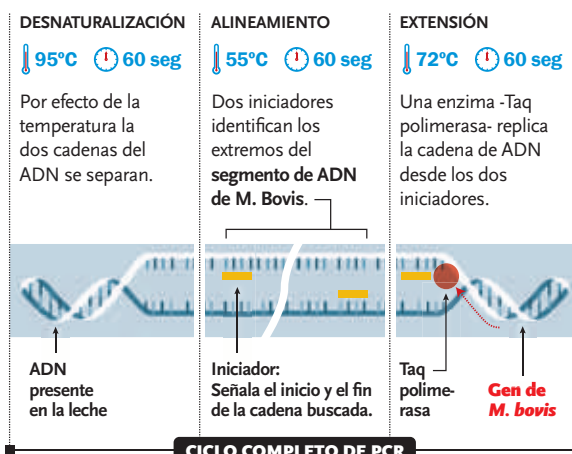
Para la toma de la muestra en el tambor es muy importante seguir un procedimiento adecuado con el fin de evitar una contaminación que afectaría el resultado final del test.

2

AMPLIFICACIÓN DE ADN POR PCR

La técnica permite la identificación y amplificación in vitro de un fragmento específico de ADN entre varios genes.

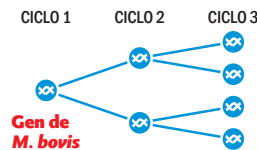
El desafío es encontrar un fragmento de ADN del bacilo *Mycobacterium bovis*, replicarlo y hacer copias suficientes para el test.



Estos tres pasos se realizan de manera automática en un termociclador, un instrumento que permite programar las variaciones de temperatura.

AMPLIFICACIÓN EXPONENCIAL

Se repite el ciclo 30 veces para hacer copias del ADN. En cada ciclo se duplica la cantidad.



30 CICLOS = Millones de copias del ADN

ENTRE EL TRES Y EL CINCO POR CIENTO DE LOS BOVINOS ESTARÍAN INFECTADOS DE TBB EN LA ARGENTINA.

che de tanque de tambor para la identificación de rodeos lecheros con TBB”, explica Zumárraga.

La técnica de PCR sirve para amplificar un fragmento de ADN a partir de una muestra mínima, por lo que suele ser muy utilizada en la identificación de virus y bacterias causantes de una determinada enfermedad. La que se utiliza en Santa Fe tiene una sensibilidad y especificidad muy alta, ya que está diseñada para **detectar sólo el patógeno buscado y no otro.**

El hecho de poder detectarlo en muestras de tanques de leche sirve como una buena fuente de información para saber si ese rodeo está infectado, por lo cual la PCR se convier-

te en una técnica adecuada para llevar un control del **estado sanitario del establecimiento.**

En este sentido, la entonces directora de Sanidad Animal del Ministerio, Ana María Canal, señala que “dentro del plan regional que se aplica en la provincia, incluimos la posibilidad de poder realizar esta técnica en leche no como diagnóstico, sino como prueba de vigilancia complementaria que apoya al productor para el seguimiento del plan sanitario dentro de su establecimiento. O sea, se utiliza para ayudar al sistema a detectar y **bajar la prevalencia de la TBB más rápidamente.**”

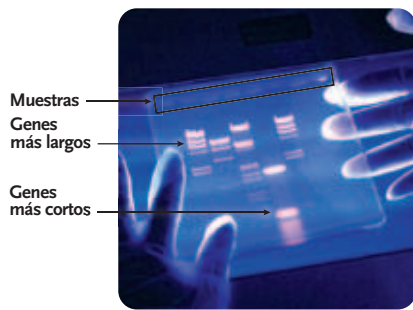
Soutullo asegura que la PCR es “una herramienta desde el punto de vista

La técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) amplifica un fragmento de ADN a partir de una muestra mínima. Suele ser muy utilizada en la identificación de microorganismos causantes de enfermedades infecciosas. En Santa Fe y en Buenos Aires se usa para detectar al bacilo que causa la Tuberculosis Bovina (TBB), a partir de una muestra del tanque de leche.

3

VISUALIZACIÓN DE LA MUESTRA DE ADN

Los genes obtenidos no son visibles al ojo humano. Para poder verlos se colocan en un gel con un colorante específico y se someten a electroforesis. El colorante “tiñe” sólo las moléculas de ADN y así permite la visualización de los genes.



Al colocar el gel en un transluminador con luz ultravioleta se pueden ver los genes en forma de “barras”.

En el gel, por efecto de la corrida electroforética, los genes se alejan de la muestra según su longitud: cuanto más corto sea el gen, más alejado hacia el extremo inferior.

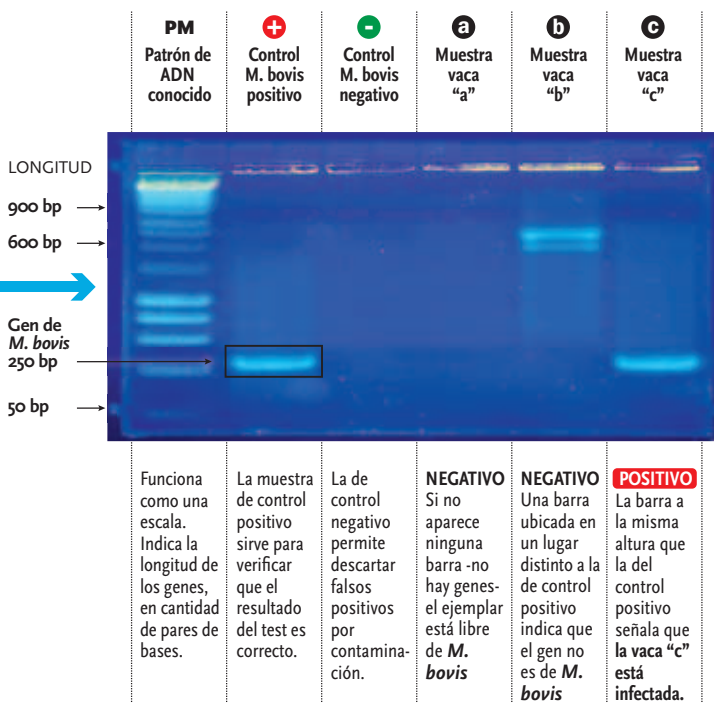
4

RESULTADO DEL TEST

Las aparición de barras en el gel y su ubicación determinan si la muestras analizadas son positivas o negativas.

COLUMNAS

Cada columna corresponde a una muestra distinta:



estatal” debido a que “con una muestra de leche la detección de *M. bovis* es más rápida y se puede tener un ‘pantallazo’ del rodeo”, aunque advierte que luego “será competencia del veterinario” ver cuál de esas vacas está infectada.

Es que esta técnica **no reemplaza a la prueba tuberculínica** que solicita de manera obligatoria el SENASA en su plan de erradicación, sino que es una herramienta importante para control epidemiológico dentro de una determinada región, útil para indicar si las acciones realizadas hasta el momento han surtido efecto o no.

Canal aclara que “la idea del Ministerio no es realizarla sobre los estableci-

mientos positivos (porque esas vacas ya fueron detectadas con la prueba de tuberculina), sino sobre los negativos para tratar de identificar si en ese establecimiento existe algún animal anérgico que no pudo responder a la prueba pero que permaneció en el rodeo y elimina bacilos por leche”.

El **peligro** de esto radica en que “dado que es una **enfermedad de evolución lenta** y pueden pasar meses (o incluso años) hasta que el animal infectado muere, un solo ejemplar puede transmitir la enfermedad a muchos otros componentes del rebaño antes de manifestar los primeros signos clínicos”, según indica un documento de la OIE.

LA NUEVA TÉCNICA NO REEMPLAZA A LA PRUEBA TUBERCULÍNICA, SINO QUE SIRVE PARA CONTROL.

PRIMER MUESTREO POR PCR EN SANTA FE

El uso de la técnica PCR para la detección de tuberculosis bovina (TBB) en Santa Fe se oficializó mediante la resolución 949/2012, por lo que esa provincia es la única que utiliza esta herramienta para la vigilancia epidemiológica de esa enfermedad.

Este plan fue aceptado por el SENASA debido a los trabajos que se han realizado años anteriores y que han permitido recabar una cantidad importante de datos de calidad.

Algunos datos del primer muestreo:

- 10 departamentos de Santa Fe fueron relevados
- 257 tambos fueron evaluados
 - 177 tenían certificación “libre” de TBB, sin embargo un 38% no eran “libres” (TBB por PCR dio positivo), el resto (62%) sí lo eran (TBB por PCR dio negativo).
 - 80 no tenían esa certificación, y en 40% de los tambos PPD(-), la PCR dio positiva.



En el primer muestreo que se realizó con PCR en Santa Fe, se estudiaron 257 tambos, de los cuales 177 tenían certificación de “libres” y 80 no. Lo que se encontró es que el 38 por ciento de ellos no eran tan “libres” como parecían...

Canal explica que existen ocasiones en las que los animales tienen las **defensas tan bajas** que no reaccionan a la prueba oficial. Aún así, ella asegura que “con la PCR se pudo demostrar a los profesionales, a los productores y al Sistema que existían tambos que a pesar de tener un certificado de ‘libre’, contenían bovinos infectados”.

Para Soutullo esto es más bien una cuestión “psicosocial” ya que “cuando las personas sienten que el Estado no

vigila nada, piensan que pueden hacer lo que quieran” y advierte que “ahora contamos con una lupa más grande para luchar contra la TBB”.

La pelea empieza por casa

Enfrentar una mayor prevalencia de esta enfermedad en una provincia es un sólo paso, aunque importante, destinado a erradicar la TBB del país. Pero para lograr ese objetivo se necesitará un **compromiso de todos los involucrados** en el sistema productivo: desde los dueños de cabañas, tambos y demás establecimientos hasta los funcionarios de los órganos de control sanitario. Cada uno es un eslabón fundamental de una cadena que no debe romperse.

LA PCR SE UTILIZA PARA AYUDAR AL SISTEMA A BAJAR LA PREVALENCIA DE LA TBB MÁS RÁPIDAMENTE.





La falta de planes regionales de vigilancia epidemiológica de TBB en otras provincias repercute en la **expansión de la enfermedad** hacia zonas no afectadas o en recuperación.

Según explica Soutullo, “la barca es una sola, y por más que Santa Fe se esmere y cuente con fuertes decisiones políticas y componentes técnicos que acompañen el programa regional, es inevitable que ingrese hacienda de otras localidades donde las acciones no son tan marcadas”.

Y, si bien la normativa del SENASA establece que se encuentra prohibida la venta de animales que hayan salido positivos en la prueba de tuberculina, “poner en un protocolo ‘positivo’ o ‘negativo’ sólo depende del movimiento

de la mano”, asegura Canal, quien advierte que “sin ética profesional ni responsabilidad, se puede cometer un grave problema”.

Hoy Santa Fe es la única provincia que posee escrito un **plan regional de lucha contra la TBB**. Allí, todos los sistemas productivos están obligados a realizar un control ya que conviven muy cercanos unos de otros. En el caso de los tambos, por primera vez se utiliza la PCR para mantener vigilado al rodeo lechero.

La ex funcionaria aclara que esta técnica sirve para detectar posibles infecciones que quizás pasan desapercibidas por los profesionales y productores. “Con ella nos **adelantamos a la enfermedad**: si la podemos captar cuando ingresa o hay baja prevalencia, le damos una mano enorme a ese profesional y a ese productor para que trate de cortar la transmisión de la enfermedad”, señala.

Por ese motivo es que sería importante que esta herramienta de control desarrollada por el INTA y el Ministerio de Producción santafesino se expanda **hacia otras provincias** que deseen mejorar sus mecanismos de control sanitario de TBB con el fin de erradicar esta enfermedad que se encuentra tan arraigada en la Argentina.

En este sentido, Soutullo asegura que “no sólo basta con tener una buena técnica en la mesada de un laboratorio si no pasa tranqueras adentro” y asegura que por ese motivo “las herramientas que tratamos de generar son realmente útiles”.

Asimismo, Cataldi considera que para el INTA “es una satisfacción” llevar adelante un desarrollo que sea utilizado. “Es el propósito que uno tiene: que no quede en un *paper*, sino que sea social, económica y políticamente aprovechable”, destaca, al tiempo que concluye que “siempre pensamos en la Ciencia y la Tecnología aplicada **desde la concepción**”.

Más información:

Ángel Cataldi - Coordinador de Biotecnología Pecuaria del Instituto de Biotecnología del INTA Castelar.

María Ana Canal - Profesora Asociada Patología Veterinaria. Facultad de Ciencias Veterinarias. Universidad Nacional del Litoral.

Adriana Soutullo - Jefa de la división Inmunología del laboratorio de Diagnóstico e Investigaciones Agropecuarias del Ministerio de la Producción de Santa Fe.

Martín José Zumárraga - Investigador del Instituto de Biotecnología del INTA Castelar.

Alejandro Abdala - Investigador de EEA-INTA Rafaela.

Héctor Tarabla - Investigador de EEA-INTA Rafaela.

