

CAPITULO 5

***Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis* (MAP) EN PURINES**

Miguel Salgado A., Med. Vet. M.Sc. Dr.Cs., Universidad Austral de Chile
Michael Collins, DVM, Ph.D., Universidad de Wisconsin-Madison, Estados Unidos

Una preocupación del uso de purines en suelos agrícolas y ganaderos se relaciona con la carga de agentes patógenos que el purín pueda contener, constituyendo un riesgo de salud pública y animal. La transmisión indirecta de un agente infeccioso puede efectuarse a través de la contaminación de las aguas superficiales, praderas, alimento, o siembras fertilizadas con purines que no han recibido un tratamiento eficiente previo. La presencia de vectores como insectos, roedores o pájaros, ayudan a la diseminación de los agentes infecciosos presentes en el purín a otros lugares. En el purín, donde el principal componente son las heces de ganado, se pueden encontrar diversos microorganismos, como bacterias, virus y parásitos (incluidos protozoos y helmintos) que podrían sobrevivir durante el manejo y almacenamiento del purín y constituir un riesgo para individuos susceptibles. Entre las bacterias presentes en el purín se destaca *Escherichia coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella spp.*, *Campylobacter jejuni* y *Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis* (MAP); mientras que dentro de los parásitos se pueden encontrar *Cryptosporidium parvum* y *Giardia spp.*

5.1. *Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis* (MAP)

Es el agente causal de la Paratuberculosis o Enfermedad de Johne. Este microorganismo es diseminado a través de la presencia y dispersión de heces de animales infectados (adultos) en el ambiente, que posteriormente son ingeridos por animales susceptibles, de menor edad. Tiene un periodo de incubación promedio en bovinos de aproximadamente 5 años, este tiempo está inversamente relacionado con la dosis de MAP ingerida. Mientras mayor es la carga ingerida, menor es el tiempo para la presentación de signos clínicos.

Esta infección afecta principalmente a rumiantes domésticos y de vida silvestre de todo el mundo, pero se ha informado también su aislamiento y detección en varias otras

especies, tales como equinos, camélidos sudamericanos, porcinos, caninos, liebres, zorros, primates no humanos y humanos. Sin embargo, sólo en conejos silvestres se ha informado infección activa y un rol en la epidemiología de la infección.

La primera descripción de la infección por MAP en Chile fue informada en 1958, y al igual que en los países con una industria láctea desarrollada, la infección por MAP se encuentra ampliamente distribuida en los rebaños bovinos, especialmente en el sur de Chile, donde están mayormente concentrados y donde las tasas de infección se han estimado altas, tanto a nivel individual como a nivel de rebaño. Por otro lado, este agente sería de importancia también en salud pública debido a que existiría una asociación con la Enfermedad de Crohn en el ser humano, aunque todavía existe controversia en este sentido ya que no se ha podido demostrar una causalidad directa.

5.1.1 Características bacteriológicas

MAP se define como un bacilo Gram positivo, ácido alcohol resistente que tiene una pared celular gruesa y rica en lípidos, particularmente ácidos micólicos, que le otorgan alta resistencia a diversas condiciones que pueden afectar su supervivencia. Todas las especies de *Mycobacterium*, a excepción de MAP, producen micobactina, un agente quelador de hierro. Debido a que el hierro es requerido para la replicación, MAP es considerado un patógeno obligado de las células mamíferas, donde el hierro se encuentra fácilmente disponible para el organismo y la micobactina no es necesaria.

Las características de su pared celular, su tendencia a formar grupos y el tener una actividad metabólica extremadamente baja, explicarían la gran resistencia de esta bacteria frente a condiciones ambientales adversas, pudiendo perdurar por más de un año en el medio ambiente. La presencia de genes de latencia, también permitiría explicar lo anterior tanto como su supervivencia en el medio intracelular. Otros investigadores han demostrado que MAP también podría resistir a ambientes con pH bajos, concentraciones altas de sal y a químicos como el cloro. Además, MAP podría sobrevivir por largos periodos de tiempo en los biofilms presentes en bebederos para animales. También se ha observado la presencia de esta bacteria en leche entera pasteurizada, de lo cual se infiere su capacidad de sobrevivir a altas temperaturas (72°C por 15 segundos), sólo si está presente en grandes cantidades en la leche cruda. También se ha observado que MAP es capaz de sobrevivir durante semanas en los protozoos que son por lo general bacterióvoros. Muchos de los estudios publicados sobre la interacción entre las micobacterias y protozoos han utilizado *M. avium* como modelo. Este

miembro del género *Mycobacterium*, que está muy estrechamente relacionada con MAP, podría sobrevivir la fagocitosis por *Tetrahymena piriformis* y especies de *Acanthamoeba*. A su vez, existen estudios que relacionan MAP con amebas ambientales, en donde se ha visto que el agente de la paratuberculosis es capaz de multiplicarse dentro de las vacuolas de protozoos y aumentar en número. También, se ha demostrado que MAP sobreviviría dentro de *Acanthamoeba spp.* (*A. castellanii* y *A. polyphaga*) y se ha hipotetizado que esta ubicación intracelular le otorgaría a la bacteria protección contra condiciones adversas del ambiente.

5.1.2 MAP en el ambiente

Luego de la salida de MAP desde el hospedador infectado a través de las heces, esta bacteria puede sobrevivir por largos períodos de tiempo en el medio ambiente contaminando diversas superficies tales como corrales de maternidad, camas, ubres, utensilios de alimentación o pastura que al contacto con la mucosa oral puede dar lugar a la ingestión de esta bacteria. Además, las vacas con paratuberculosis también pueden eliminar MAP directamente en la leche o calostro, por lo que el consumo de estos productos por terneros susceptibles también puede resultar en infección. La sobrevivencia de MAP, de forma viable, en heces puede variar entre 152 y 246 días en heces mantenidas al aire libre, por lo que las praderas pueden ser una importante fuente de infección, por lo menos durante un año. En términos de sobrevivencia, se ha demostrado que el pH del suelo y altas concentraciones de hierro en éste estarían relacionadas positivamente con la sobrevivencia de MAP en el medio ambiente, encontrándose así mayores tiempos de sobrevivencia en suelos secos y alcalinos.

5.1.3 Destino de MAP en purín bovino de lechería

En relación con el movimiento de MAP en el suelo agrícola, estudios realizados en Chile por investigadores de la Universidad Austral de Chile e INIA Remehue demuestran que posterior a la aplicación de purines contaminados con MAP, la bacteria tiende a permanecer en los estratos superiores del suelo y se mueve de forma lenta a través de él. Esto reafirma que la permanencia de la bacteria en la pradera y en las capas superficiales del suelo representa un claro riesgo relacionado a la infección por MAP en animales en pastoreo y una potencial contaminación hacia otros lugares a través de su escurrimiento en aguas superficiales. Posteriormente, los mismos autores con el fin de observar el movimiento superficial de esta bacteria en suelos con pendiente y en aguas de escurrimiento, demostraron que MAP se podría movilizar a través del agua de escurrimiento superficial luego de lluvias naturales en parcelas que recibieron purín contaminado con MAP, detectando su

presencia hasta 106 días post inicio del estudio, además de detectar la presencia de esta bacteria en muestras de suelo hasta por 100 días.

5.1.4 Estrategias de tratamiento de la carga de MAP

Con respecto a la sobrevivencia de MAP en purín, se sabe que bajo condiciones anaeróbicas, este podría sobrevivir por 252 y 98 días en purín bovino almacenado a 5°C y 15°C, respectivamente. Otros estudios sugieren que durante digestión anaeróbica de estiércol bovino de lechería en plantas de biogas bajo condiciones mesofílicas (35°C) y termofílicas (53 a 55°), MAP podía ser aislado hasta 21 días y menos de 24 horas, respectivamente. Así, a temperaturas de 55°C se logra disminuir la persistencia de MAP después de 3 días de tratamiento. Los mismos autores, demostraron que se requieren al menos 175 días de acopio de purín, para reducir de forma significativa la concentración de la bacteria presente. Más recientemente, otro estudio realizado en una planta de biogas, mostró que MAP podría ser totalmente controlado bajo un estricto proceso de fermentación. Sin embargo, se encontró ADN de MAP en muestras de todas las estaciones de la planta por al menos 16 meses desde la apertura.

La práctica de estos tratamientos sobre purines y otros desechos es imprescindible para muchos sistemas productivos en todo el mundo. Estos procedimientos presentan ciertas dificultades al querer integrarlos a los sistemas agropecuarios en Chile, y principalmente a la producción lechera bovina. Esto se debe en primer lugar, a que los purines son manejados en forma líquida, lo cual dificulta considerablemente la práctica del sistema de compostaje de estos residuos, si no se invierte en un sistema de secado para obtener un material sólido. En segundo lugar, la digestión anaeróbica puede incurrir en elevados costos asociados principalmente a la compra e instalación de biodigestores, lo que puede representar un obstáculo en su aplicación para muchos productores lecheros.

5.1.5 Efecto de tratamientos químicos

Existe una gran gama de alternativas en cuanto al uso de tratamientos químicos en desechos de la producción animal, existiendo una gran variedad de compuestos químicos que se han utilizado en distintas sustancias como agua, con el objetivo de disminuir la carga de patógenos perjudiciales y hacer a estas sustancias más inocuas para la salud humana y animal. Entre estos compuestos se encuentran el KMnO_4 , que puede oxidar compuestos orgánicos a través diferentes vías de reacción. La ruta de reacción que se produce de manera significativa depende de la estructura de los sustratos y la acidez de las soluciones. Se ha descrito que el

usar permanganato de potasio como tratamiento químico en una concentración de 10 mg por litro de KMnO_4 resulta en lisis celular total de cianobacterias, no encontrándose células íntegras después de 6 horas de exposición.

Existen también los desinfectantes alcalinos, que actúan generando la denaturación de las proteínas estructurales de los microorganismos. La adicción de compuestos alcalinos en el purín podría liberar también NH_3 , que es considerado como otro método de desinfección asociado con el alto pH en el purín. Este gas es tóxico para humanos, animales, plantas y microorganismos, y se ha propuesto que el tratamiento del purín y otros compuestos orgánicos basados en NH_3 podrían inactivar ciertos virus, bacterias y parásitos. Este gas podría afectar la persistencia de MAP en el purín, por la acción conjunta con los compuestos alcalinos. Sin embargo, por otra parte la pérdida de nitrógeno por la volatilización del amoníaco implicaría una reducción del valor nutritivo disponible del purín para las praderas y cultivos, y un potencial impacto en el medio ambiente en general.

La utilización de compuestos en base a cal han sido largamente empleados como neutralizadores de pH en suelos ácidos, también poseen la capacidad de inactivar diversos virus y bacterias presentes en la materia orgánica. Aditivos químicos conocidos en base a cal, son el óxido de calcio (CaO) y su derivado el hidróxido de calcio (Ca(OH)_2), los cuales presentan ventajas en cuanto a su uso en purines, debido principalmente a que demuestran ser solubles en agua, son de fácil manejo y bajo costo en relación a otras técnicas de tratamiento de desechos orgánicos. Además, logran reducir la emanación de algunos gases causantes de malos olores. El CaO es un compuesto inestable que reacciona con las moléculas de agua liberando energía calórica (reacción exotérmica) y en esta interacción se conduciría a la formación de Ca(OH)_2 , que tiene una eficacia demostrada en el control de poblaciones bacterianas que están presentes en el purín de aves. Por lo tanto, esto podría explicar que el uso de CaO aseguraría una mayor eficiencia en la reducción de MAP presente en el purín, porque se elevaría la temperatura del sustrato debido a la reacción exotérmica además de elevar el pH del material a niveles altamente alcalinos.

En nuestro país, no existe por el momento un sistema de tratamiento de purines que entregue a los productores lecheros la alternativa de utilizar un método seguro para controlar la diseminación de agentes infecciosos de transmisión fecal-oral como MAP en rumiantes domésticos dentro de los rebaños. Al mismo tiempo, se deben considerar aspectos prácticos en la aplicación de dichos tratamientos en

los sistemas productivos lecheros. Es decir, poder asociarlo al sistema actual de almacenamiento de purines en forma líquida, reunir las condiciones económicas para su puesta en marcha y permitir seguir utilizando los beneficios de la aplicación de purines como fertilizantes orgánicos sobre los suelos cultivables.

Estudios realizados en la Región de Los Lagos, mostraron que en los tratamientos en base a cal se aumentó el pH de la suspensión de 7 a 12 (en agua), lo que dio lugar a una reducción de la supervivencia de MAP, aunque tomó 72 h para producir una reducción significativa o eliminación de MAP en la suspensión. Se encontraron diferencias altamente significativas ($p = 0,0001$) entre los tratamientos con respecto a la viabilidad de MAP, siendo los tratamientos más efectivos KMnO_4 al 2,5% y CaO al 3% versus el tratamiento control. El tratamiento con 2,5% KMnO_4 eliminó completamente MAP viable inmediatamente después del tratamiento. En el caso de CaO 3%, sólo disminuyó significativamente el organismo viable a las 24 y 48 h ($p < 0,05$), sin embargo, a 72 h se registró la completa eliminación de este organismo. Los tratamientos ácidos no afectaron la supervivencia MAP.

En condiciones experimentales, este estudio sugiere métodos prácticos para controlar MAP en purín. Tanto la cal como el KMnO_4 , que son potentes agentes oxidantes, han sido eficaces en las concentraciones utilizadas. Esta información debe ser considerada además para futuros planes de manejo para el control de la infección por MAP en las poblaciones de animales susceptibles y podría ser considerado como una buena práctica de manejo para reducir los patógenos en purines en lecherías.