

Informe final publicable de proyecto Generación de un banco de cepas y ADN estandarizado para estudios epidemiológicos de *Mycobacterium bovis* en Uruguay

Código de proyecto ANII: FMV_3_2018_1_148718

05/11/2021

BERNÁ, Luisa (Responsable Técnico - Científico)

CASTRO RAMOS, Miguel Angel (Investigador)

FRESIA CORONEL, Pablo (Investigador)

ROBELLO PORTO, Carlos (Investigador)

SALABERRY, Ximena (Investigador)

SUANES MARTINEZ, Alejandra (Investigador)

CARRASCO MUÑOZ, Valentina (Investigador)

INSTITUTO PASTEUR DE MONTEVIDEO (Institución Proponente) \\ INSTITUTO PASTEUR DE MONTEVIDEO \\
MINISTERIO DE GANADERÍA, AGRICULTURA Y PESCA. DIVISIÓN DE LABORATORIOS VETERINARIOS "MIGUEL C RUBINO" \\
MINISTERIO DE GANADERÍA, AGRICULTURA Y PESCA. DIVISIÓN DE LABORATORIOS VETERINARIOS "MIGUEL C RUBINO"

Resumen del proyecto

La tuberculosis bovina (TBB) es una enfermedad infecto-contagiosa crónica del ganado que en ocasiones afecta a otras especies de mamíferos incluyendo al hombre. Recientemente se ha observado una duplicación en el número de establecimientos positivos a TB en Uruguay, generando preocupación en el sector ganadero, así como en las autoridades sanitarias pertinentes. El ganado detectado positivo a T. Bovis se mantiene aislado y es sacrificado. Algunas muestras son posteriormente cultivadas para confirmar el agente infeccioso. Sin embargo esto se realiza para un número reducido de muestras y no se realizan otro tipo de análisis de vanguardia que permitan estudiar la epidemiología de la enfermedad como ser la tipificación. Para poder evaluar la epidemiología de las enfermedades micobacterianas es fundamental poder discriminar a los miembros del complejo Mycobacterium tuberculosis. La diversidad genómica entre cepas de M. bovis es un factor importante en la determinación de la patogénesis que puede influir en el grado de virulencia, transmisibilidad, y respuesta del huésped. El diseño de estrategias e intervenciones en salud pública basadas en evidencias sobre la evolución, aparición y propagación de enfermedades infecciosas es uno de los principales objetivos de la epidemiología actual. El seguimiento que permita el trazado de las cepas de M. bovis circulantes en nuestro país con el fin de estudiar la dinámica de la TBB en Uruguay en relación a los datos genéticos/genómicos es de suma importancia. El objetivo de este proyecto es realizar un plan piloto para establecer un banco de aislados y ADN que permita el seguimiento de la enfermedad a través de estudios bioquímicos y marcadores genéticos, que permita predecir el desarrollo de la enfermedad y más importante ayude a establecer políticas concisas para el control de la enfermedad.

Ciencias Agrícolas / Producción Animal y Lechería / Ciencia Animal y Lechería (la biotecnología animal va en "Biotecnología Agropecuaria") / Microbiología - Biología Molecular - Genómica

Palabras clave: Tuberculosis, Mycobacterium bovis, producción animal, salud animal, salud pública, cultivo, ADN, genoma / / /

Introducción

La tuberculosis bovina (TBB) es una enfermedad infecto-contagiosa crónica que afecta principalmente al ganado, incidiendo principalmente sobre los nódulos linfáticos y pulmones del huésped. Su agente causal Mycobacterium bovis es un bacilo Gram positivo, ácido-alcohol-resistente que pertenece al complejo Mycobacterium tuberculosis (MTBC). M. bovis, además de afectar al ganado, puede afectar otras especies de mamíferos, incluyendo a humanos (Muller y col. 2013, McDaniel y col. 2013, Pérez-Lagos y col. 2013) y a otros animales salvajes que actúan como reservorios de la enfermedad y hacen que la erradicación de la misma sea más difícil (Delahay y col. 2001, Delahay y col. 2006). Esta zoonosis es un problema mundial de importancia socioeconómica; afecta actividades agropecuarias que impactan sobre la producción de leche y carne y producen graves pérdidas económicas (O'Reilly y col. 1995). La infección de ganado por M. bovis se traduce en un posible riesgo en la salud humana, ya sea mediante el consumo de productos contaminados con el bacilo o como riesgo ocupacional en personas con contacto cercano a animales infectados (Robinson y col. 1988, Torres-González y col. 2013). El período de incubación de M. bovis es prolongado y en el ganado puede llegar a varios meses. La principal vía de ingreso a un rebaño es la introducción de bovinos enfermos o portadores de M. bovis. En Uruguay, actualmente la TBB está restringida casi exclusivamente a la ganadería lechera. Los decomisos por tuberculosis en bovinos de carne son históricamente bajos, coincidiendo con la baja probabilidad de contagio en las condiciones de producción extensiva del ganado de carne (Garín 2011). Sin embargo, la detección de reservorios de fauna silvestre (Serraino y col. 1999; Romero y col. 2006) y la reciente introducción del feedlot en el sistema de producción de carne, renuevan la importancia de los estudios epidemiológicos para determinar el papel de éstos en la persistencia de la TBB en Uruguay, así como también para evaluar su impacto en salud pública. Al respecto desde el año 2011 la Dirección General de Servicios Ganaderos (DGSG), con un equipo multidisciplinario que involucra a diferentes Facultades de la UdelaR, trabaja en la vigilancia epidemiológica del jabalí, haciendo hincapié en enfermedades zoonóticas (Castro y col. 2015). El actual aumento de la tuberculosis en humanos a nivel global, particularmente en casos de inmunodeficiencia, ha renovado el interés por la importancia zoonótica de M. bovis. En 2012 se diagnosticó el primer caso en Uruguay de tuberculosis causada por M. bovis en tres humanos, siendo la presentación y evolución muy similar a la tuberculosis causada por Mycobacterium tuberculosis (Rivas y col. 2012). En Uruguay la vigilancia epidemiológica de TBB se realiza a través del examen post mortem en plantas de faena habilitadas por el Servicio Oficial Veterinario y pruebas de tuberculina en la refrendación anual en rebaños lecheros que remiten a planta de faena. El diagnóstico rutinario (certificación, refrendación,

saneamiento) lo realizan veterinarios de libre ejercicio habilitados por la DGS. En casos sospechosos de enfermedad, el Servicio Oficial realiza diagnósticos confirmatorios. En abril 2016 a marzo 2017 hubo en Uruguay 1454 animales con TBB, correspondientes a 37 focos, los cuales fueron a faena sanitaria obligatoria. Actualmente, existen 40 focos abiertos según lo reportado hasta junio de 2018 siendo Florida (10), Canelones (5) y San José (8) los departamentos con mayor número de focos, los departamentos restantes presentan entre 1 y 3 focos. El diagnóstico bacteriológico es la prueba de referencia (gold standard) y debe emplearse para la confirmación de la infección. A pesar de los esfuerzos sostenidos tanto del ámbito público como privado, algunos focos son de difícil control y/o erradicación. En los últimos años se ha priorizado la investigación dentro de la plataforma de salud animal en enfermedades zoonóticas con alto impacto en producción ganadera. En el año 2013 se conformó un grupo multidisciplinario para trabajar en esta temática gracias a la financiación del INIA a través del fondo FPTA No 328 (Crosi y col 2018; Lasserre y col. 2015, Lasserre y col. 2017). El mismo involucra actores con diferentes capacidades científico-tecnológicas: DGS-MGAP, Facultad de Veterinaria y el Institut Pasteur de Montevideo. Primariamente se tuvo como objetivo profundizar en las técnicas diagnósticas en TBB, la tipificación y secuenciación de cepas de *M. bovis* circulantes en Uruguay. Este proyecto permitió por un lado realizar estudios iniciales sobre otras pruebas diagnósticas alternativas al test de la tuberculina para su posible utilización en focos de TBB. Así mismo se validó un protocolo de PCR en tiempo real para ser aplicado sobre muestras de ganglios de animales positivos. Por otro lado este proyecto reveló una variabilidad genómica y estructura poblacional de *M. bovis* mayor a la esperada (Lasserre y col. 2017). Se describieron tres grupos de cepas y se creó la hipótesis de que uno de estos grupos presenta una larga historia en el país mientras los otros dos parecen haber ingresado recientemente. Estos resultados corroboran la utilidad de las estrategias basadas en la comparación de secuencias genómicas, pero además muestran que la variabilidad de las cepas de *M. bovis* que circulan en Uruguay no ha sido totalmente caracterizada. En este sentido, queda en evidencia la necesidad de monitorear las infecciones de TBB con métodos basados moleculares y genómicos, así como generar material e información sistemática que pueda utilizarse para generar políticas sanitarias efectivas a mediano plazo. De hecho, actualmente la epidemiología molecular de las infecciones por *M. bovis* en animales y el hombre es usada como una nueva herramienta para estudiar la transmisión de la TBB (Egbe y col. 2017; El-Sayed y col. 2016).

Metodología/diseño del estudio

Durante este proyecto fueron procesadas muestras de tejidos de animales provenientes de los distintos focos reportados entre agosto de 2019 y abril de 2021. Los animales reaccionantes a la tuberculina cervical comparativa serán seguidos hasta la faena, donde se tomaron muestras de ganglios y otros órganos para su estudio. Dichas muestras se recibieron en el Departamento de Bacteriología de la DILAVE "Miguel C. Rubino". En el laboratorio se realizó una inspección macroscópica de los tejidos en busca de lesiones granulomatosas. En paralelo se separaron muestras gemelas para realizar histopatología y bacteriología. Las fracciones remitidas a la Sección de Histopatología de la DILAVE "Miguel C. Rubino", fueron mantenidas en formol bufferado al 10%. Posteriormente se redujeron y se incorporaron en parafina. Se consideraron positivas a la histopatología, aquellas muestras en las cuales se determinó la formación de granulomas con centro de necrosis caseosa y con una reacción conformada por macrófagos, células epitelioides y células gigantes. Una vez que la muestra fue incluida en parafina se realizaron cortes de la misma a 4 micras. Posteriormente se colorearon con hematoxilina y eosina, procediendo a su visualización al microscopio.

Las muestras para bacteriología se descontaminaron con ácido oxálico al 5% (Tacquet y col., 1967) y se trituraron por un sistema mecánico (stomacher). El homogenato fue centrifugado y el sedimento sembrado en los medios selectivos de Stonebrink y Löwenstein-Jensen, incubándose a 37°C en estufa de cultivo durante dos meses, con registro diario de temperatura y con lecturas semanales de las siembras efectuadas para observar su desarrollo y posible contaminación bacteriana. Los procedimientos bacteriológicos siguieron las técnicas estandarizadas según los métodos recomendados por OPS/OMS, 1979 y OIE, 2000. Del mismo sedimento utilizado para la siembra se realizó una tinción por la técnica de Ziehl Neelsen, para verificar la presencia de Bacilos Ácido Alcohol Resistentes (BAAR).

La caracterización bacteriológica incluye pruebas culturales: morfología de colonias, tiempo y temperatura de crecimiento, cromogenicidad, crecimiento en medios selectivos y complementación de pruebas bioquímicas como: niacina, reducción de nitrato, hidrólisis de Tween 80 a los 5 y 10 días, ureasa, catalasas a temperatura ambiente y a 68°C, pirazinamidasas y telurito de potasio al 2% (Runyon, 1980, OIE, 2000).

Como método de preservación se utilizó una suspensión de leche descremada/Skim Milk y glicerol (10% del total del volumen). El volumen utilizado de leche descremada estéril fue de 200 microlitros.

Los viales fueron conservados en un freezer a -20°C (Gruft H y col. 1968).

Se realizó la extracción de ADN por temperatura, se verificó mediante PCR la presencia del complejo Mycobacterium tuberculosis (MTBC) y posteriormente Mycobacterium bovis.

Se cuantificó y alicuotó el ADN para su conservación en el banco de ADN (dos submuestras) y el envío para el secuenciado genómico.

Resultados, análisis y discusión

Se procesaron un total de 149 muestras, que fueron cultivadas individualmente para su caracterización. Se realizaron un total de 111 aislamientos de M. bovis y su caracterización mediante Tinción de Ziehl-Neelsen. Cada muestra fue analizada y sus datos rastreados en las bases de datos del DILAVE para completar la información sobre el origen, ubicación, características del hospedero, infección, etc. Cada aislamiento fue replicado para generar un cultivo para el banco de cepas y la extracción de ADN para el banco de ADN. Estas muestras se procesaron de forma duplicada para mantener un respaldo de cepas y ADN. El ADN fue procesado, cuantificado y se verificó por PCR la identidad de los aislados como M. bovis. Las muestras fueron alicuotadas y enviadas a un servicio de secuenciación masiva para secuenciar su genoma completo. Se estandarizó una nomenclatura para nominar al banco de cepas y adn y se establecieron las características a disponibilizar de cada aislamiento. En el momento el banco con aislamientos de M.bovis y su respectivo ADN se encuentra en el DILAVE con un respaldo respectivo en el Institut Pasteur de Montevideo. Se realizó la capacitación de recursos humanos de forma satisfactoria. Se divulgaron parte de los resultados en la SUM y se está procesando un audiovisual para público general que estará disponible en los primeros meses del año entrante.

Conclusiones y recomendaciones

Durante este proyecto llevamos a cabo un plan piloto para generar un banco de cepas y adn de Mycobacterium bovis. Se realizó satisfactoriamente la formación de recursos humanos en el área y se logró establecer el banco de cepas y adn estandarizado con una base de datos asociada y la secuenciación genómica de las muestras. La secuenciación permite identificar la variabilidad y estructura de la población de las cepas de M. bovis circulantes en Uruguay, corroborando la utilidad de este tipo de estrategias. Es imprescindible el cruzamiento de datos de las cepas con los datos geográficos y epidemiológicos que pueden permitir identificar factores responsables de la generación de infecciones y focos y en consecuencia identificar medidas que puedan reducir los costos asociados.

Referencias bibliográficas

Bibliografía

Crosi G, Suanes A, Fernández F, Núñez N, Castro Ramos M, Salaberry X, Juambeltz A, Gil A. Effect of tuberculin tests and gamma interferon test repeatedly used in tuberculosis-infected and non-infected cattle of Uruguay. *Animal Husbandry, Dairy and Veterinary Science Journal*. Aceptado Marzo 2018.

Egbe NF, Muwonge A, Ndip L, Kelly RF, Sander M, Tanya V, Ngwa VN, Handel IG, Novak A, Ngandalo R, Mazeri S, Morgan KL, Asuquo A, de C Bronsvooort BM. Molecular epidemiology of *Mycobacterium bovis* in Cameroon. *Sci Rep*. 2017; 7(1):4652. doi: 10.1038/s41598-017-04230-6.

El-Sayed A, El-Shannat S, Kamel M, Castañeda-Vazquez MA, Castañeda-Vazquez H. Molecular Epidemiology of *Mycobacterium bovis* in Humans and Cattle. *Zoonoses Public Health*. 2016 Jun;63(4):251-64. doi: 10.1111/zph.12242.

Garin A. 2011. Programa de control y erradicación de la tuberculosis bovina en el Uruguay. Foro Internacional sobre Tuberculosis Bovina, México, 28 y 29 de julio.

Howard G, Clark ME, Osterhout M. Preservation of Mycobacterial Cultures *Applied Microbiology*, Feb. 1968; p. 355-357

Lasserre M, Fresia P, Greif G, Iraola G, Castro-Ramos M, Juambeltz A, Nuñez Á, Naya H, Robello C, Berná L. Whole genome sequencing of the monomorphic pathogen *Mycobacterium bovis* reveals local differentiation of cattle clinical isolates. *BMC Genomics*. 2018 Jan 2;19(1):2. doi: 10.1186/s12864-017-4249-6.

Rivas C, Greiff G, Coitinho C, Araujo L, Laserra P, Robello C. Primeros casos de tuberculosis pulmonar por *Mycobacterium bovis*. Una zoonosis reemergente en Uruguay. *Rev Méd Urug* 2012; 28(3): 209-214

Romero B, Aranaz A, de Juan L, Alvarez J, Bezos J, Mateos A, Gómez-Mampaso E, Domínguez L. Molecular epidemiology of multidrug-resistant *Mycobacterium bovis* isolates with the same profile as isolates from animals. *J Clin Microbiol* 2006; 449:3405-3408.

Serraino A, Marchetti G, Sanguinetti V, Rossi MC, Zanoni RG, Catozzi L, Bandera A, et al. Monitoring of transmission of tuberculosis between wild boars and cattle: genotypical analysis of strains by molecular epidemiology techniques. *J Clin Microbiol* 1999; 379:2766-2771.

Licenciamiento

Reconocimiento-NoComercial-Compartir Igual 4.0 Internacional. (CC BY-NC-SA)