

ARTÍCULO ESPECIAL

Gac Med Bilbao. 2023;120(4):200-204



Aplicación de nuevos marcadores inmunológicos y genéticos asociados a infecciones causadas por *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* en el diagnóstico y control de la paratuberculosis bovina

Canive María^a, Alonso-Hearn Marta^a

a) NEIKER-Instituto Vasco de Investigación y Desarrollo Agrario. Basque Research and Technology Alliance. Departamento de Sanidad Animal. Bizkaia, España

Recibido el 23 de junio de 2023; aceptado el 27 de junio de 2023

PALABRAS CLAVE

Paratuberculosis.
Biomarcadores.
Inmunología.
Genética.
Programas de selección.

Resumen:

En este trabajo se describen los avances más significativos obtenidos en el marco de la tesis doctoral titulada "*Marcadores inmunológicos y genéticos asociados a infecciones causadas por Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis en ganado bovino*" que fue realizada por Maria Canive en el departamento de Sanidad Animal de NEIKER bajo la supervisión de la Dra. Marta Alonso-Hearn y defendida el 25 de marzo de 2022 en la Facultad de Medicina y Enfermería de la Universidad del País Vasco, programa Doctorado en Inmunología, Microbiología y Parasitología. La Tesis Doctoral obtuvo la calificación de Sobresaliente cum laude y ha sido recientemente galardonada con un accésit del Premio Syva a la mejor Tesis Doctoral defendida en España, México y Portugal en el año 2022. En la Tesis, se ha utilizado una aproximación multidisciplinar empleando metodologías microbiológicas, inmunológicas, genéticas, "ómicas", y bioinformáticas. Es este enfoque innovador y original de las técnicas utilizadas lo que ha sido valorado muy positivamente por el Tribunal de la empresa farmacéutica SYVA.

© 2023 Academia de Ciencias Médicas de Bilbao. Todos los derechos reservados.

Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis eragindako infekzioekin lotutako markatzaile inmunologiko eta genetiko berriak aplikatzea behien paratuberculosisaren diagnostikoan eta kontrolean

Lan honetan, "*Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis behi-aziendak eragindako infekzioei lotutako markatzaile inmunologikoak eta genetikoak*" izeneko doktoretza-tesiaren esparruan lortutako aurrerapen esanguratsuenak deskribatzen dira. Maria Canivek egin zuen tesia NEIKEReko Animalien Osasun Sailean, Marta Alonso-Hearn doktorearen ikuskaritzapean, eta 2022ko martxoaren 25ean defendatu zen Euskal Herriko Unibertsitateko Medikuntza eta Erizaintza Fakultatean, Immunologia, Mikrobiologia eta Parasitologiako Doktoretza Programan. Doktorego Tesiak Bikain cum laude kalifikazioa lortu zuen eta berriki Espainian, Mexikon eta Portugalen defendatutako Doktorego Tesi Onenaren Syva Sariko akzesit bat jaso du 2022an. Tesian, diziplina anitzeko hurbilketa bat erabili da metodologia mikrobiologikoak, immunologikoak, genetikoak, "omikoak" eta bioinformatikoak erabiliz. Erabilitako tekniken ikuspegi berritzaile eta original hori oso positibotzat jo du SYVA enpresa farmazeutikoaren Auzitegiak.

© 2023 Academia de Ciencias Médicas de Bilbao. Eskubide guztiak gordeta.

Applying new immunological and genetic markers associated with infections caused by *Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis* is essential for the diagnosis and control of paratuberculosis

In this work, the most significant advances achieved within the framework of the doctoral thesis titled "Immunological and genetic markers associated with infections caused by *Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis* in cattle" are described. The thesis was conducted by Maria Canive in the Department of Animal Health at NEIKER under the supervision of Dr. Marta Alonso-Hearn. It was defended on March 25, 2022, at the Faculty of Medicine and Nursing of the University of the Basque Country, as part of the Ph.D. program in Immunology, Microbiology, and Parasitology. The doctoral thesis received the qualification of Outstanding cum laude and was recently honored with a mention of the Syva Award for the best doctoral thesis defended in Spain, Mexico, and Portugal in 2022. The thesis employed a multidisciplinary approach, utilizing microbiological, immunological, genetic, "omics," and bioinformatics methodologies. The innovative and original nature of the techniques used in this approach was highly appreciated by the Tribunal of the pharmaceutical company SYVA.

© 2023 Academia de Ciencias Médicas de Bilbao. All rights reserved.

GILTZA-HITZAK

Paratuberculosis.
Biomarkatzaileak.
Immunologia.
Genetika.
Hautaketa-programak.

KEYWORDS

Paratuberculosis.
Biomarkers.
Immunology.
Genetics.
Selection programs.

Introducción

Uno de los principales problemas sanitarios del ganado vacuno lechero que condiciona la fertilidad, la producción lechera y la longevidad de los animales es la paratuberculosis (PTB). La PTB es una enteritis granulomatosa crónica causada por *Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis* (MAP) que supone un importante problema económico y social por las pérdidas económicas tan importantes que genera en las explotaciones de vacuno de leche a nivel mundial. Se ha calculado que más del 50% de las explotaciones de vacuno de leche en Europa están infectadas. La ingestión de MAP a través de la comida, leche o agua contaminada con las heces de los animales infectados constituye la principal vía de transmisión de MAP. La PTB es un proceso de curso predominantemente subclínico, estimándose que por cada animal que presenta clínica en el rebaño, al menos otros 25 animales podrían estar

infectados y son en muchos casos difícilmente detectables por las técnicas de diagnóstico tradicionales. La infección por MAP afecta principalmente a los últimos tramos del intestino delgado, yeyuno e íleon, y a los linfonodos mesentéricos asociados. Los signos clínicos en el ganado vacuno se caracterizan por un lento y progresivo deterioro y adelgazamiento del animal, con disminución de la producción láctea y diarrea, en un principio intermitente pero que se hace constante y severa en los estados más avanzados de la enfermedad. Estos signos se van agravando y conducen a un estado de malnutrición, debilitamiento y, por último, a la muerte del animal.

Importancia económica y social de la paratuberculosis

Por tratarse de una infección intestinal crónica es fácil comprender que tendrá una repercusión en la ca-

pacidad productiva del animal, con pérdidas de producción de leche que se han estimado entre los 500 y 3.000 Kg por lactación, y con una disminución significativa de la longevidad. También se ha documentado una mayor incidencia de mamitis y de otras enfermedades y pérdidas de fertilidad en las vacas infectadas. Por todo ello, la paratuberculosis es una enfermedad que preocupa tanto a ganaderos como a los veterinarios. De singular importancia es la asociación de MAP con la enfermedad de Crohn y otras enfermedades gastrointestinales y autoinmunes en los humanos y la sospecha de que MAP pueda transmitirse al ser humano fundamentalmente a través del agua y leche contaminadas. La enfermedad de Crohn es una afección inflamatoria intestinal, crónica, que presenta características clínicas y patológicas muy similares a la paratuberculosis. MAP ha sido encontrada en muestras de enfermos de Crohn, aunque no en todos, por lo que es un tema objeto de controversia en la comunidad científica internacional¹. El impacto sanitario y socio-económico de la paratuberculosis ha sido reconocido por la Organización Internacional de Sanidad Animal que la incluye en la lista del Código Sanitario para los Animales Terrestres estableciendo la obligatoriedad de su notificación.

Diagnóstico y control de la paratuberculosis bovina

No existe un tratamiento eficaz para esta enfermedad y la vacunación está prohibida en la mayoría de países debido a su interferencia con el diagnóstico de la tuberculosis bovina. Por ello, en la actualidad el control de la paratuberculosis bovina se lleva a cabo mediante la instauración de medidas higiénico-sanitarias y de bioseguridad en las explotaciones ganaderas, dirigidas a evitar que los animales más susceptibles, generalmente los menores de un año, entren en contacto con las heces de los animales infectados y mediante la detección y eliminación de animales positivos a las técnicas de diagnóstico. Las técnicas laboratoriales más comúnmente utilizadas son el ELISA para la detección de anticuerpos anti-MAP en el suero de los animales infectados y la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para la detección de DNA de MAP en heces. Uno de los problemas de los programas de control de MAP basados en el saneamiento de los animales infectados es que las técnicas de diagnóstico actuales no son suficientemente sensibles para detectar animales que no muestran signos de enfermedad y en los que la carga bacteriana y los niveles de anticuerpos producidos están por debajo de los niveles de sensibilidad de las técnicas de diagnóstico actuales. El método diagnóstico ideal tendría que ser rápido y sensible de tal forma que permitiese a los ganaderos detectar de manera rápida a los animales que están excretando la micobacteria y asegurarse de que los animales que compra estén libres de infección.

Nuevas estrategias para el diagnóstico y control de la paratuberculosis basadas en biomarcadores inmunológicos y genéticos

Los resultados obtenidos en esta Tesis Doctoral han dado lugar a cinco publicaciones^{2, 3, 4, 5, 6} que proporcionan información nueva y global acerca de los mecanis-

mos moleculares subyacentes a la susceptibilidad a la infección por MAP y a la tolerancia a la PTB con aplicaciones en el diagnóstico y control de la enfermedad. En cuanto a las metodologías empleadas, en esta Tesis Doctoral se ha empleado secuenciación masiva de RNA (RNA-Seq) para la detección de biomarcadores dirigidos al diagnóstico temprano de la infección causada por MAP en vacas de la raza Holstein² y se han identificado marcadores genéticos asociados a la susceptibilidad y tolerancia a la paratuberculosis (PTB) mediante estudios de asociación a genoma completo (genome-wide association studies, GWAS^{4, 5, 6}). Algunos de los biomarcadores identificados mediante la tecnología de RNA-Seq, como el transportador ABCA13 y la intelectina, han permitido desarrollar nuevos métodos de diagnóstico para la detección de animales subclínicos difícilmente detectables con las técnicas tradicionales de diagnóstico.

¿Es posible seleccionar animales menos susceptibles y más tolerantes a la PTB bovina? ¿Y a otras enfermedades?

La genética específica de cada animal es uno de los factores más importantes implicados en la susceptibilidad/tolerancia/resistencia a la infección por MAP por lo que una de las estrategias de control más comúnmente aceptada es la que se basa en la selección de animales que por su genética son menos susceptibles, más resistentes y/o tolerantes a la PTB⁷. En este sentido, en la presente Tesis Doctoral se han llevado a cabo tres análisis de asociación a genoma completo utilizando datos de genotipado imputado a secuencia completa de unas 1000 vacas frisonas y fenotipos pre-mortem (ELISA para la detección de anticuerpos frente a MAP) y postmortem (PCR y cultivo de tejido para la detección de MAP, y análisis histopatológico de lesiones intestinales). La combinación de varios métodos diagnósticos mejoró las estimas de heredabilidad (h^2) respecto al uso de métodos individuales remarcando la importancia de una correcta definición del fenotipo. En el primer estudio, la combinación de ELISA-PCR-cultivo ($h^2 = 0,139$) permitió identificar 159 polimorfismos de nucleótido único (single-nucleotide polymorphisms, SNPs) asociados a la susceptibilidad a la infección por MAP⁴. En el segundo estudio se identificaron un total de 129 y 92 SNPs asociados con la presencia de lesiones multifocales ($h^2 = 0,057$) y difusas ($h^2 = 0,189$), respectivamente⁵. En el tercer estudio de asociación se buscaron variantes asociadas con la tolerancia a la PTB⁶. Se consideró que un animal era tolerante si era positivo a PCR y cultivo bacteriológico de tejidos pero no presentaba lesiones asociadas a la PTB en tejido intestinal. La heredabilidad del fenotipo de tolerancia fue alta ($h^2 = 0,55$) identificándose 40 SNPs y 98 genes candidatos asociados a este fenotipo que permitieron definir un perfil inmunogenético específico de los animales tolerantes diseñado para reparar daños en el DNA, controlar la carga bacteriana, limitar el daño tisular y favorecer el establecimiento de una infección persistente.

¿Y a otras enfermedades?

Los mecanismos asociados con la tolerancia a la PTB, parecen ser inespecíficos, por lo que la selección genética de animales más tolerantes a la PTB podría conducir a mejoras simultáneas en otras enfermedades, lo que repercutiría en una mayor productividad de las explotaciones ganaderas al ser capaces de aumentar el número de lactaciones por animal y reducir el reemplazo de los animales en producción.

Inclusión de la PTB como un carácter más dentro de los programas de selección de la raza frisona

Históricamente la mejora genética en vacuno de leche ha estado orientada a incrementar la producción de leche, tanto en cantidad como en calidad. En la actualidad, caracteres funcionales como la longevidad y el número de días abiertos se han incorporado en los índices de selección como el índice genético combinado (ICO). También se incluyen caracteres relacionados con la salud animal como el recuento de células somáticas para evitar problemas de mastitis, otra de las enfermedades que causa mayores pérdidas económicas al ganadero, y el índice de salud podal que nos indica la resistencia de los animales a las cojeras por enfermedades en las pezuñas. En cuanto a la PTB, los polimorfismos identificados en esta tesis doctoral se han incluido en el Chip de genotipado que habitualmente utiliza la Confederación Nacional de Frisonas Españolas (CONAFE) en sus programas de mejora genética y se han generado modelos predictivos que permiten clasificar a los animales de cualquier población de acuerdo a sus susceptibilidad y tolerancia a la paratuberculosis.

Perspectivas

En colaboración con CONAFE, los marcadores genéticos identificados en esta Tesis Doctoral se integrarán en un futuro próximo en los programas de selección genética de la raza frisona española con el objetivo de seleccionar animales menos susceptibles a la infección por MAP y más tolerantes a la PTB, y probablemente también a otras enfermedades, lo que redundará en una mejora de la salud, longevidad y bienestar animal, minimización del uso de agentes antimicrobianos y aparición de resistencias frente a los mismos, reducción de las pérdidas económicas que soportan las explotaciones ganaderas ocasionadas por los desvíes prematuros, descenso de la productividad, y las causadas por el elevado costo de las medidas de saneamiento que son las únicas de las que se dispone actualmente. No se debería escoger una vaca solo porque sea tolerante a la paratuberculosis, pero si además es óptima para el resto de caracteres, ¿por qué no escogerla? De esta forma, la reposición recaerá en las novillas propias de las explotaciones, sanas y productivas (consideradas como "élite") y de alta resiliencia a esta enfermedad. El fin último es potenciar la productividad de estas explotaciones con un menor impacto en la emisión de gases con efecto invernadero manteniendo las producciones con menos animales. La mejora genética basada

en la inclusión de marcadores genéticos de resistencia a enfermedades es un proceso a medio-largo plazo que depende de la presión selectiva que se le quiera dar al carácter, pero sus resultados son acumulativos y permanentes a través de generaciones pudiendo conducir a la erradicación de enfermedades. La selección de animales menos susceptibles y más tolerantes a la paratuberculosis beneficiaría especialmente a aquellas áreas geográficas donde la enfermedad es muy prevalente y donde la vacunación no está permitida por su interferencia con los métodos de diagnóstico de la tuberculosis bovina. Una posible futura certificación a cerca del estatus infeccioso respecto a esta enfermedad sería deseable desde todos los puntos de vista: de cara a ofrecer productos seguros al consumidor, obtener una posición privilegiada para la venta de animales y a la vez disponer de establos libres donde comprar animales.

El aumento de la fiabilidad de los nuevos marcadores genéticos asociados a la paratuberculosis que se consigue con el empleo de las nuevas tecnologías genómicas y la mejora de la información aportada por el genotipado de los animales a nivel de genoma completo harán que en un futuro próximo la incorporación de nuevos caracteres de salud como la resistencia genética a la paratuberculosis y a otras enfermedades al índice de selección sea una realidad.

Financiación y colaboradores

La Tesis Doctoral ha sido desarrollada en el marco de los proyectos MAKPARA (Marcadores inmunológicos y genéticos asociados infecciones causadas por *Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis*, RTA2014-00009-C02-01) y PARACON (Soluciones innovadoras e integradas para el diagnóstico y control de la paratuberculosis bovina basadas en genómica, transcriptómica y digital PCR, RTI2018-094192-R-C21), financiados por el Instituto de Investigación y Desarrollo Agrario (INIA) y por el Ministerio de Ciencia e Innovación (AEI/10.13039/501100011033/FEDER, UE). Durante su periodo formativo, María disfrutó de un contrato predoctoral para Joven Personal Investigador en Formación financiada por el INIA (FPI2016-0041) y realizó una estancia nacional en el grupo del Dr. Oscar González-Recio del Departamento de Mejora Genética Animal del INIA. Para el desarrollo de esta Tesis Doctoral, se ha contado con la colaboración del Departamento de Matemática Aplicada de NEIKER, del Área de Sanidad Animal del Servicio Regional de Investigación y Desarrollo Agroalimentario del Principado de Asturias (SERIDA), del departamento de Genética, Antropología Física y Fisiología Animal (UPV/EHU), de la Confederación de Asociaciones de Frisona Española (CONAFE) y de la red académica i2basque.

Bibliografía

1. Juste R.A., et al. (2008). On the prevalence of *M. avium* subspecies paratuberculosis DNA in the blood of healthy individuals and patients with inflammatory bowel disease. PLoS ONE. 3:3-8.

2. Alonso-Hearn M, et al. (2019). RNA-Seq analysis of ileocecal valve and peripheral blood from Holstein cattle infected with *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis revealed dysregulation of the CXCL8/IL8 signaling pathway. *Sci Rep.* 9(1):14845.
3. Canive M, et al. (2021). Identification of loci associated with susceptibility to bovine paratuberculosis and with the dysregulation of the MECOM, eEF1A2, and U1 spliceosomal RNA expression. *Sci Rep.* 11:1–14.
4. Canive M, et al. (2021). Identification of loci associated with susceptibility to *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis infection in Holstein cattle using combinations of diagnostic tests and imputed whole-genome sequence data. *PLoS ONE.* 16:1–17.
5. Canive M, et al. (2021). Identification of loci associated with pathological outcomes in Holstein cattle infected with *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis using whole-genome sequence data. *Sci Rep.* 11:1–13.
6. Canive M, et al. (2022). A genome-wide association study for tolerance to paratuberculosis identifies candidate genes involved in DNA packaging, DNA damage repair, innate immunity, and pathogen persistence. *Front Immunol.* 13:1–14.
7. Alonso-Hearn M, et al. (2022). Genome-wide association studies for the identification of cattle susceptible and resilient to paratuberculosis. *Front Vet Sci.* 9.