

**Paratuberculosis
en ganado lechero de Corrientes**

*Martinis Mercado, Daniela S. - Cicuta, María E. - Boehringer, Silvia I.
Paolicchi, Fernando* - Morsella, Claudia**

Cátedra de Microbiología - Facultad de Ciencias Veterinarias - UNNE.
Sargento Cabral 2139 - (3400) Corrientes - Argentina.
Teléfono: +54 (03783) 425753 Int.165 - Fax: +54 (03783) 425753 - E-Mail: patqui@vet.unne.edu.ar
) Estación Experimental Agropecuaria INTA Balcarce. C.C.276. 7620. Balcarce(Bs.As.). Argentina.

ANTECEDENTES

La paratuberculosis o enfermedad de Johne es una enfermedad infecciosa crónica que afecta a rumiantes domésticos y silvestres. Es producida por *Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis*, un bacilo de crecimiento lento que requiere de micobactina férrica para desarrollar. Se han aislado micobacterias dependientes de humanos con enfermedad de Crohn, que presenta síntomas similares con la paratuberculosis (Collins, 1997; Ponce y Barrera, 1989). Este bacilo infecta a los macrófagos de la lámina propia del intestino y linfonódulos asociados (Merkal, 1970), produce una enteropatía granulomatosa dando como resultado deficiente absorción de nutrientes esenciales y acelerada pérdida de proteínas. Esta micobacteria tiene como vía principal de transmisión la fecal/oral, pero también lo hace a través del útero y la leche de vacas infectadas (Collins, 1994). Los animales infectados clínicamente excretan entre $1,3 \times 10^5$ y $5,9 \times 10^6$ organismos/g de materia fecal, mientras que los portadores subclínicos excretan entre 40 y 100 organismos/g de materia fecal (Mason et al., 1997). Los animales adquieren la enfermedad dentro de los primeros 6 meses de vida, ya que la leche contaminada es fuente potencial de contagio, y manifiestan signos clínicos de diarreas persistentes y pérdidas de peso 2 a 5 años más tarde (Clarke, 1997). En las hembras provoca un descenso en la producción láctea que va del 5 al 25% en los estadios tempranos, desde la primera lactación y acorta su vida productiva media (Collins, 1994; Nordlund et al., 1996). Debido a la falta de tratamiento y a que la eliminación de sólo los sintomáticos no basta para controlar la enfermedad, cualquier programa de control debe incluir métodos para identificar y separar animales infectados (Wilson et al., 1995; Vanschaik et al., 1996) haciendo especial énfasis en el riesgo de contacto de los terneros con animales adultos, manteniendo en lo posible áreas libres de contaminación con materia fecal de los últimos. El cultivo es el método más efectivo para detectar infección en el ganado aparentemente sano, con una especificidad del 100% (Merkal, 1984), teniendo los inconvenientes de su lentitud (4 a 6 meses) y baja sensibilidad (50%). Otro método de identificación presuntiva, en los primeros estadios de la enfermedad, es la prueba tuberculínica intradérmica comparativa, realizada en la tabla del cuello o pliegue ano caudal utilizando PPD-bovino (PPD-B) y PPD-aviar (PPD-A) de mayor poder discriminatorio que la simple. Si bien la misma tiene bajo poder predictivo positivo, del orden del 22%, posee sin embargo, un buen poder discriminatorio negativo, del 95% (Cicuta, 1999). Teniendo en cuenta que la paratuberculosis ha sido diagnosticada en animales bovinos del nordeste argentino (NEA) (Cicuta et al, 1995), nuestro objetivo fue investigar el estado de situación en el ganado lechero del NEA.

MATERIALES Y METODOS

Se visitaron 4 establecimientos lecheros ubicados en la provincia de Corrientes (localidades de San Isidro, San Cosme y Capital), realizando la prueba intradérmica comparativa en el pliegue anocaudal, a 8 bovinos machos y 36 bovinos hembras adultos, utilizando PPD-A y PPD-B provistos por el DILAB/SENASA, con una concentración proteica de 0,5 mg/ml (=25.000 UI) y 1 g/ml (=32.500 UI), respectivamente. Fueron considerados positivos (+) aquellos animales que presentaron un aumento ≥ 3 mm. Con el suero se realizó el test de ELISA indirecto que utiliza 100µl de antígeno protoplasmático de paratuberculosis (PPA-3) Cepa 18 en 0,05M de buffer carbonato de sodio adherido a microplacas e incubado toda la noche a 4°C. Se lavó 3 veces con solución tween Salina (TS). Se adhirió 100µl del suero preabsorbido con *M. phlei*(1:2) y diluido

UNIVERSIDAD NACIONAL DEL NORDESTE
Comunicaciones Científicas y Tecnológicas 2000

1:50 en solución buffer fosfato con tween 80 y gelatina (PBS-TG) y se incubó 2hs. a 15°C. Se lavó la placa 3 veces con PBS-TG (6°C). Se agregó 100 µl de conjugado diluido (Ig. G Peroxidasa) incubándose 1 ½s. a 15 °C, lavándose luego 3 veces con PBS-TG. Se agregó 100µl del sustrato (ABTS) y leyó a 405nm en lector Allied Monitor 3 veces cada dos minutos. Se calcularon los índices de ELISA de los sueros testeados dividiendo el promedio de las densidades ópticas(DO) por el promedio del control negativo conocido. Se consideró sospechoso aquel suero con índice de 1,51-2,1 y positivo con índice de 2,116 más. Se realizó el cálculo de proporciones de ambas pruebas utilizando Software Statistix versión 3.2 bajo entorno windows (F.C.V.- U.N.N.E.), aplicando la fórmula $p = x_0 / n$ y para el intervalo de confianza: $p \pm Z_{1-\alpha/2} \cdot \sqrt{p \cdot q} / n$.

DISCUSION DE RESULTADOS

Los resultados obtenidos de los 44 bovinos en los que se realizaron las pruebas diagnósticas, figuran en el Cuadro 1. Respecto a la prueba tuberculínica intradérmica comparativa en el pliegue ano caudal, 9 de 44 bovinos fueron positivos a PPD-A y 3 a PPD-B. En la prueba de ELISA 6 sueros fueron positivos y 8 sospechosos.

Cuadro 1: Pruebas diagnósticas de Paratuberculosis en 44 bovinos

Establecimiento	Nº de Animales	PPD A positivo	PPD B positivo	ELISA	
				Positivo	Sospechoso
A	20	5	1	1	1
B	7	-	-	1	3
C	6	2	1	-	-
D	11	2	1	4	4
Total	44	9	3	6	8

Referencias:

PPD A: Derivado proteínico purificado Aviar
PPD B: Derivado proteínico purificado Bovino

La proporción de bovinos positivos a PPDA en esta población con una confianza de 95%, es de 0,204, y el intervalo de confianza es $0,204 \pm 0,119$ (0,085 - 0,323). La proporción de bovinos positivos a ELISA con una confianza de 95%, es de 0,136, y el intervalo de confianza es $0,136 \pm 0,099$ (0,037 - 0,235) y la de bovinos sospechosos a ELISA es de 0,181, cuyo intervalo de confianza es $0,181 \pm 0,112$ (0,069-0,293)

La prueba intradérmica comparativa es de valor limitado, debido a que no es altamente específica ya que detecta animales sensibilizados al *M. avium* (Moreira et al.,1991), y tiene reacción cruzada con la tuberculosis (De Diego, 1991), pero al poseer un poder discriminatorio negativo del 95%(Cicuta, 1999) y reaccionar en los primeros estadios de la enfermedad cuando hay abundantes bacilos en el intestino (De Diego, 1991), puede utilizarse para tener una visión general de la situación de la enfermedad en un establecimiento. El test de ELISA detecta inmunidad humoral por anticuerpos circulantes contra *M. avium subsp. paratuberculosis* en animales clínicamente enfermos o subclínicamente infectados (Moreira et al.,1991),con una sensibilidad de 66% y especificidad de 99% (utilizando análisis por ROC, Med Calc. Program), aumentando la primera a partir de los 4 años de edad y la segunda con la absorción del suero con *M. phlei*(OIE, 1996). Es en la actualidad uno de los test más utilizados en conjunto con otros métodos diagnósticos como el cultivo de materia fecal, pudiendo detectar aquellos animales que presentan infección subclínica (Stabel, 1998).

UNIVERSIDAD NACIONAL DEL NORDESTE
Comunicaciones Científicas y Tecnológicas 2000

CONCLUSIONES

Por los datos obtenidos hasta el momento queda confirmada la evidencia de infección por *M. avium subsp. paratuberculosis* en el ganado lechero de Corrientes, pero al no haber aislado, aún, cepas de *M. avium subsp. paratuberculosis* no es posible concluir sobre el estado de la enfermedad en el NEA.

BIBLIOGRAFIA

- Cicuta, M.E.; Boehringer, S.I.; Roibón, W.R.; Bernardelli, A.; Bakos, E.; Benitez, M.C.; Kunert, J.A. y Aragón, L.R. 1995 Paratuberculosis in cattle and sheep of the North East of Argentina. The Paratuberculosis Newsletter, 7 (1): 18 - 23 .
- Cicuta, M.E. 1999 Validez de la prueba tuberculínica en el diagnóstico de paratuberculosis bovina en el NEA. Revista de Medicina Veterinaria, 80(2):72-74 .
- Clarke, C.J. 1997 The Pathology and Pathogenesis of paratuberculosis in ruminants and other species. J. Comp. Path., 116:217-261.
- Collins, M.T. 1994 Clinical approach to control of bovine paratuberculosis. JAVMA, 204 (2): 208 – 210.
- Collins, M.T. 1997 Mycobacterium paratuberculosis: A potential food-borne pathogen?. Journal of Dairy Science, 80 (12):3445-3448.
- Collins, M.T.; Sockett, D.C.; Goodger, W.J.; Conrad, T.A.; Thomas, C.B. and Carr, D.J. 1994 Herd prevalence and geographic distribution of, and risk factors for, bovine paratuberculosis in Wisconsin. JAVMA, 204(4):636-641.
- De Diego, A.I. 1991. Enfermedades de los bovinos. Editorial Hemisferio Sur S.A. 1º edición. Buenos Aires, Argentina.
- Mason, O; Rowe, M.T. and Ball, H.J. 1997 Is 'Mycobacterium paratuberculosis' a possible agent in Crohn's disease? Implications for the dairy industry. Milchwissenschaft-Milk Science International 52 (6):311-316 .
- Merkal, R.S. 1970 Diagnostic methods for detection of paratuberculosis (Johne's disease) Proceedings of 74 Annual Meeting U.S. Animal Health Assoc.:620-623.
- Merkal, R.S. 1984 Paratuberculosis: Advances in cultural, serologic, and vaccination methods. JAVMA, 184(8):939-943 .
- Moreira, A.R. and Tosi, J.C. 1991 Paratuberculosis bovina. Importancia de la enfermedad en la región. ¿Es posible su control?. Informe técnico N°1 Proyecto Incremento de la producción de carne del Salado. EEA INTA Balcarce.
- Nordlund, K.V.; Goodger, W.J.; Pelletier, J. and Collins, M.T. 1996 Associations between subclinical paratuberculosis and milk production, milk components and somatic cell counts in dairy herds. JAVMA, 208 (11): 1872 – 1876.
- Office International des Epizooties – World Organisation for Animal Health. 1996 OIE Manual: Paratuberculosis (Johne's disease) Chapter 3.1.6: 218 - 228.
- Ponce, G. y Barrera, L. 1989 Micobacterias: su posible rol etiológico en la enfermedad de Crohn. Infectología y Microbiología clínica 1 (2): 48 – 52.
- Stabel, J.R. 1998 Johne's Disease: A Hidden Threat. J. Dairy Sci, 81:283-288 .
- Vanschaik, G.; Kalis, C.H.J.; Benedictus, G.; Dijkhuizen, A.A. and Huirne, R.B.M. 1996 Cost-benefit analysis of vaccination against paratuberculosis in dairy cattle. Veterinary Record, 139 (25): 624 – 627.
- Wilson, D.J.; Rossiter, C.; Han, H.R. and Sears, P.M. 1995 Financial effects of 'Mycobacterium paratuberculosis' on mastitis milk production, and cull rate in clinically normal cows. Agri-Practice, 16 (3): 12 – 18.