

Paratuberculosis en ganado lechero de Corrientes

**Martinis Mercado, Daniela S. - Cicuta, María E. - Boehringer, Silvia I.
Paolicchi, Fernando¹ - Morsella, Claudia¹ - Roibón, Walter R.
Benitez, Maria.C. - Barceló, M. C. - Miranda, A. O.**

*Cátedra de Microbiología - Cátedra de Inmunología General y Aplicada.
Facultad de Ciencias Veterinarias - UNNE.
Sargento Cabral 2139 - (3400) Corrientes - Argentina.
Teléfono/Fax: +54 (3783) 425753 / 425753 Interno 165
E-mail: patqui@vet.unne.edu.ar*

1. Estación Experimental Agropecuaria INTA Balcarce - CC. 276 - (7620) Balcarce - Buenos Aires - 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 micobactina dependientes de humanos con enfermedad de Crohn, que presentan síntomas similares (Collins, 1997; Ponce y Barrera, 1989). Este bacilo infecta a los macrófagos de la lámina propia del intestino y linfonódulos asociados (Merkal, 1970), produciendo una enteropatía granulomatosa que ocasiona 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 eliminan entre 40 y 100 organismos/g de materia fecal (Mason et al., 1997). Los animales adquieren la enfermedad dentro de los primeros seis meses de vida, ya que la leche contaminada es potencial fuente 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 estadíos 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, con una especificidad del 100%, es el método más efectivo para detectar infección en el ganado aparentemente sano (Merkal, 1984), teniendo los inconvenientes de su lentitud (4 a 6 meses) y baja sensibilidad (50%). Otro método de identificación presuntiva, en los primeros estadíos 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), la posibilidad de la eliminación del bacilo en leche (Taylor et al., 1981; Sweeney et al., 1992 y Streeter et al., 1995), su resistencia a la pasteurización (Grant et al., 1996 y Sung et al., 1998) y su probable vinculación con la enfermedad de Crohn en humanos (Ponce y Barrera, 1989, Collins, 1997 y Mason et al., 1997), nuestro objetivo fue investigar el estado de situación en el ganado lechero del NEA.

MATERIALES Y METODOS

Se tomaron muestras de sangre, materia fecal y leche de 4 establecimientos lecheros ubicados en la provincia de Corrientes (localidades de San Isidro, Laguna Pampín y Capital), realizando la prueba intradérmica comparativa en el pliegue ano caudal, 77 bovinos hembras y 2 bovinos machos adultos, utilizando PPD-A y PPD-B de la Dirección de Laboratorios (**DILAB**) del Servicio Nacional de Sanidad Animal (**SENASA**) y

Sanidad Ganadera, 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 = o > 3 mm.

Con el suero de cada animal se realizó el test de ELISA indirecto y PARACHEK™. El primero utiliza 100 µl de antígeno protoplasmático de paratuberculosis (PPA-3, Allied Monitor), Cepa 18, en 0,05M de buffer carbonato de sodio adherido a microplacas (Dynatech) e incubado toda la noche a 4°C. Se lavó 3 veces con solución tween salina (TSS). Se adhirió 100µl del suero preabsorbido con *M. phlei* (1:2) y diluido 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 a 6°C. Se agregó 100 µl de Ig.G Peroxidasa incubándose 1 h 30 min. a 15 °C, lavándose luego 3 veces con PBS-TG. Se agregó 100µl del sustrato ABTS (azinobis diamonium salt) y leyó a 405 nm 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 2,11 ó más.

El test PARACHEK™ Johnes Absorbed EIA, (CSL Veterinary, Australia), fue realizado de acuerdo a las instrucciones del laboratorio. La media de la absorbancia, leída a 450 nm., del control negativo fue <0,150 y la del control positivo entre 0,900 y 1,200. El valor de corte fue la media del control negativo más 0,100 y se consideró positiva la muestra con un valor de absorbancia mayor que el valor de corte.

Para el cultivo, aproximadamente 10 g de materia fecal fueron agitados durante 30 minutos en 100 ml de cloruro de hexadecilpiridinium (HPC) al 0,75% para decontaminar. Se dejó reposar 30 minutos y 40 ml del sobrenadante fueron transferidos a tubos plásticos, tapa a rosca, previa agitación manual. Transcurridos 3 minutos, se extrajo los 40 ml del sobrenadante y se dejaron los tubos en posición vertical a temperatura ambiente durante toda la noche. Pasado ese tiempo se sembró 0,4 ml del sedimento en cada uno de 4 tubos de medio de Herrold (1 sin micobactina, 1 con micobactina, 1 con micobactina y piruvato y otro con micobactina, ácido nalidíxico, 30 µg/ml, vancomicina 1 µg/ml y anfotericina B 501 µg/ml SIGMA). Los tubos se incubaron a 37°C en posición horizontal durante 48 horas, posteriormente en posición vertical. Se realizó la lectura de los medios a los 30, 60 y 160 días, observando el desarrollo de colonias con características de *Mycobacterium avium subespecie paratuberculosis*.

En el caso de cultivo de leche, se centrifugaron 150 ml a 2500 rpm durante 30 minutos; 2 ml del pellet obtenido se resuspendieron en 20 ml de HPC al 0,75% para decontaminar durante toda la noche. Pasado este tiempo se centrifugó a 2000 rpm durante 20 minutos. Se eliminó el sobrenadante y se resuspendió el sedimento en solución fisiológica estéril, dejando reposar unos minutos y se sembró e incubó de acuerdo con lo descrito para materia fecal.

Se realizó el cálculo de proporciones de ambas pruebas utilizando Software Statistix versión 3.2 bajo entorno windows (Facultad de Ciencias Veterinarias- 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 79 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, sólo 1 de los 79 bovinos fue positivo a PPD-B. En la prueba de ELISA 16 sueros fueron positivos y 36 sospechosos. En el Test de PARACHEK™ 6 sueros fueron positivos. En cuanto al cultivo de materia fecal y de leche, aun no se obtuvo resultados.

Cuadro 1: Pruebas diagnósticas de Paratuberculosis en 44 bovinos

Establecimiento	Nº de Animales	PPD A Positivo	PPD B Positivo	PARACHEK™ Positivo	ELISA	
					Positivo	Sospechoso
A	9	-	-	1	3	3
B	20	-	1	3	8	10
C	34	-	-	-	5	13
D	16	-	-	2	0	10
Total	79	0	1	6	16	36

REFERENCIAS:

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

La proporción de bovinos positivos a PPD-B en esta población, con una confianza de 95%, es de 0,013, y el intervalo de confianza es $0,013 \pm 0,02548$ (0,01198 - 0,03798). La proporción de bovinos positivos a ELISA con una confianza de 95%, es de 0,202, y el intervalo de confianza es $0,202 \pm 0,0882$ (0,1138 - 0,2902) y la de bovinos sospechosos a ELISA es de 0,456, cuyo intervalo de confianza es $0,456 \pm 0,10976$ (0,34624 - 0,56576). La proporción de bovinos positivos a PARACHEK™ con una confianza de 95%, es de 0,076, y el intervalo de confianza es $0,076 \pm 0,0588$ (0,0172 - 0,1348).

CONCLUSIONES

La prueba intradérmica comparativa es de valor limitado, debido a que posee una sensibilidad de 26,8% y una especificidad de 72% (Pavlik et al.,1999), detecta animales sensibilizados a *M. avium* (Moreira et al.,1991), y tiene reacción cruzada con la tuberculosis (De Diego, 1991), Sin embargo en un estudio previo realizado en esta región (Cicuta, 1999), el poder discriminatorio negativo de esta prueba se eleva al 95% y reacciona muy bien en los primeros estadios de la enfermedad cuando hay abundantes bacilos en el intestino (De Diego, 1991), puede ser utilizada 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 con infección clínica o subclínica (Moreira et al.,1991), con una sensibilidad del 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). En la actualidad es 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).

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 el agente etiológico, no es posible concluir sobre el estado de la enfermedad en el NEA.

BIBLIOGRAFIA

- 1- 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 .
- 2- 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 .
- 3- Clarke, C.J. (1997) The Pathology and Pathogenesis of paratuberculosis in ruminants and other species. J. Comp. Path., 116:217-261.
- 4- Collins, M.T.(1994) Clin. approach to control of bov. paratuberculosis. JAVMA, 204(2):208– 210.
- 5- Collins, M.T.(1997) Mycobacterium paratuberculosis:A potential food-borne pathogen?. Journal of Dairy Science, 80 (12):3445-3448.
- 6- 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.
- 7- CSL Ltd. Vet. Div.(1998) PARACHEK™ Johne's Absorbed EIA for the detection of paratuberculosis in cattle Instructions for use.
- 8- De Diego, A.I.(1991) Enferm. de los bovinos. Ed. Hemisferio Sur S.A. 1ª Ed. Bs. Aires, Argentina.
- 9- Grant, I.R.; Ball, H.J.; Neill, S.D. and Rowe, M.T.(1996) Inactivation of *Mycobacterium paratuberculosis* in cows'milk at pasteurization temperatures. Applied and Environmental Microbiology, 62 (2): 631 – 636.
- 10- 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.
- 11- 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.
- 12- Merkal, R.S.1984 Paratuberculosis: Advances in cultural, serologic, and vaccination methods. JAVMA, 184(8):939-943 .

- 13- Moreira,A.R. and Tosi,J.C.1991 Paratuberculosis bov. Importancia de la enfermedad en la región.¿Es posible su control?.Inf. Téc.Nº1Proy. Increment. de la prod. de carne del Salado. EEA INTA Balcarce.
- 14- 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.
- 15- Oficce International des Epizooties – World Organisation for Animal Health.1996 OIE Manual: Paratuberculosis (Johne's disease) Chapter 3.1.6: 218 - 228.
- 16- Pavlik,I.;Vesely, T.; Bartl, J.; Horvathova, A.; Matlova, L.; Vrbas, V.; Valent, L.; Miskovic, P. and Hirko, M. 1999. Reliability of diagnostic methods (Clinical examination, faecal culture, skin and serologic tests) for Paratuberculosis of cattle and sheep during the 1988-1998 Eradication and Control Programme. Proceedings of the Sixth International Colloquium on Paratuberculosis 371-382.
- 17- Ponce,G. y Barrera, L.1989 Micobacterias: su posible rol etiológico en la enfermedad de Crohn. Infectología y Microbiología clínica 1 (2): 48 – 52.
- 18- Stabel, J.R.1998 Johne´s Disease: A Hidden Threat. J. Dairy Sci, 81:283-288 .
- 19- Streeter, R.N.; Hoffsis, G.F.; Bechnielsen, S.; Shulaw, W.P.; Rings, M. 1995 Isolation of *Mycobacterium paratuberculosis* from colostrum and milk of subclinically infected cows. Am. J. Of Vet. Res., 56 (10): 1322 – 1324.
- 20- Sung, N and Collins, M.T. 1998 Thermal tolerance of *Mycobacterium paratuberculosis*.Applied and Environmental Microbiology, 64 (3):999-1005.
- 21- Sweeney, R.W.; Whitlock, R.H. and Rosenberger, A.E. 1992 *Mycobacterium paratuberculosis* cultured from milk and supramammary lymph nodes of infected asymptomatic cows. J.Clin.Microbiol. , 30: 166 – 171.
- 22- Taylor, T.K.; Wilks, C.R. and McQueen, D.S.1981 Isolation of *Mycobacterium paratuberculosis* from the milk of a cow with Johne'disease. Vet. Rec., 109: 532 – 533 .
- 23- 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. Vet. Record, 139 (25): 624 – 627.
- 24- Wilson, D.J.; Rossiter, C.; Han, H.R. and Sears, P.M.1995 Finantial effects of ´Mycobacterium paratuberculosis´ on mastitis milk production, and cull rate in clinically normal cows. Agri-Practice, 16 (3): 12 – 18.