



## **RTA02-048. Paratuberculosis bovina en Asturias. Prevalencia y evaluación de la interferencia con la prueba de la tuberculina**

### **Investigador responsable Organismo**

José Miguel Prieto Martín SERIDA

### **Equipo investigador**

Alberto Espí Felgueroso	SERIDA
Isabel Márquez Llano-Ponte	"
Ana Balseiro Morales	"
Francisco García Marín	Universidad de León
Ana Mateos García	Univ. Complut. Madrid

### **Objetivos**

- Establecer y valorar las reacciones cruzadas de los animales infectados con *M. avium paratuberculosis* con la prueba de la intradermorreacción que se emplea en la campaña de saneamiento de la tuberculosis bovina en Asturias.
- Estudiar la prevalencia de la paratuberculosis bovina en Asturias.

### **Resultados**

#### **Valoración de las reacciones cruzadas en los animales infectados con *M. avium subsp. paratuberculosis* (MAP) con la prueba de la tuberculina (IDTB)**

Se seleccionaron un total de 189 bovinos adultos mayores de 12 meses, 184 hembras y cinco machos, pertenecientes a diferentes concejos de Asturias y a distintas razas. La población de animales fue categorizada en dos grupos: grupo 1, formado por 117 animales pertenecientes a 55 rebaños que fueron reaccionantes positivos a la prueba de la IDTB y grupo 2 formado

por 72 animales pertenecientes a 67 rebaños que no reaccionaron a la IDTB. De los 189 animales, en 187 de los casos las muestras fueron tomadas después del sacrificio en el matadero. En los otros dos casos las muestras se tomaron en la propia explotación, tras la muerte del animal. Se realizó un examen macroscópico de los diferentes tramos de intestino, así como de los linfonodos ileocecales y yeyunales, y se tomaron muestras de la válvula ileocecal y de uno o dos linfonodos ileocecales. Además, en 54 animales se recogió el linfonodo yeyunal caudal. En los dos animales que murieron en la explotación se tomaron muestras de la válvula ileocecal, íleon, yeyuno y heces, así como de los linfonodos ileocecal, yeyunal caudal e ileal. Las muestras fueron sometidas a estudios serológicos, histológicos, inmunohistoquímicos y PCR, y en 55 animales se están realizando cultivos bacteriológicos para la identificación del *Map*. Por otro lado, se está trabajando con 16 rebaños de diferentes concejos de Asturias, oficialmente indemnes de tuberculosis y que presentaron signos clínicos de paratuberculosis. Todos son rebaños de raza frisona de alta producción lechera. En estos casos, a todos los animales se les tomó una muestra de sangre de la vena o arteria caudal, con tubos de extracción de sangre heparinizados y con tubos normales para obtención de suero sanguíneo. La sangre heparinizada se procesó inmediatamente con la técnica del gamma interferón, mientras que el suero se congeló a  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta su procesamiento. A todos los animales se les realizó la prueba de la IDTB simple para la detección de tuberculosis, coincidiendo con la campaña oficial de saneamiento. Con la muestra de sangre se realizaron las pruebas de inmunidad humoral (ELISA e IDGA) y las de inmunidad celular (gamma interferón).

Como resultados preliminares, cabe señalar que los granulomas observados aparecen formados por macrófagos en su mayoría, en un



número que oscila, desde cinco en los granulomas más pequeños hasta 20 en los más grandes. En cuanto al estudio comparativo de la prueba de IDTB, en el grupo 1 se encontraron lesiones focales en el 37,6 % de los animales, multifocales en el 2,75 % y difusas en el 1,71%. En cuanto al grupo 2, las lesiones focales fueron encontradas en el 41,66 % de los animales, multifocales en el 1,39 % y difusas en el 8 %.

### **Prevalencia de la paratuberculosis bovina en Asturias**

Para determinar la prevalencia anual de la paratuberculosis y su evolución, se utilizó el banco de sueros de los años 1995, 1996, 1997, 1998, 1999, 2000 y 2001, elaborados a partir de las muestras procedentes de las Campañas de Saneamiento Ganadero. A partir del banco de sueros, se tomó una muestra aleatoria sistemática a intervalo regular. Para determinar el tamaño de la muestra, se utilizó el programa informático Win Episcope 1.0. Deseándose un nivel de confianza del 95% y fijando la prevalencia esperada en el 28,21%, el tamaño de muestra obtenido fue  $n=312$ , habiendo tenido en cuenta un tamaño de población de 450.000 animales. La prevalen-

cia esperada se estimó sobre la base de los resultados obtenidos en un estudio anatómico-patológico sobre 131 animales. En total, se analizaron 2.184 sueros. Por otro lado, con la misma población de animales que se utilizó para valorar las reacciones cruzadas, se determinó la prevalencia de *Map* por métodos histopatológicos. En estos animales se recogió la válvula ileocecal, el linfonodo ileocecal y el linfonodo yeyunal caudal.

Los análisis serológicos se realizaron con el test del Institut Pourquier, llevándose a cabo la técnica y la interpretación de los resultados tal como indica la casa comercial. Todas las muestras de tejidos fueron procesadas histológicamente, fijadas en formol tamponado, incluidas en parafina y teñidas con hematoxilina-eosina. En 85 muestras se realizó una tinción inmunohistoquímica, empleando como anticuerpo primario un policlonal frente a *Map* o sus antígenos, obtenido a partir de un suero hiperinmune de conejo anti-*Map*. En otras 30 muestras se realizó una PCR que inserta la secuencia específica de *Map* IS900.

La seroprevalencia obtenida se muestra en la figura 1; ésta fue del 2,25% en 1995, 1,28% en 1996, 0,96% en 1997, 0,64% en 1998, 0,64% en 1999, 1,60% en 2000 y 1,28% en 2001. La media de todos los años fue del 1,23 %. La evolución de la enfermedad a lo largo de

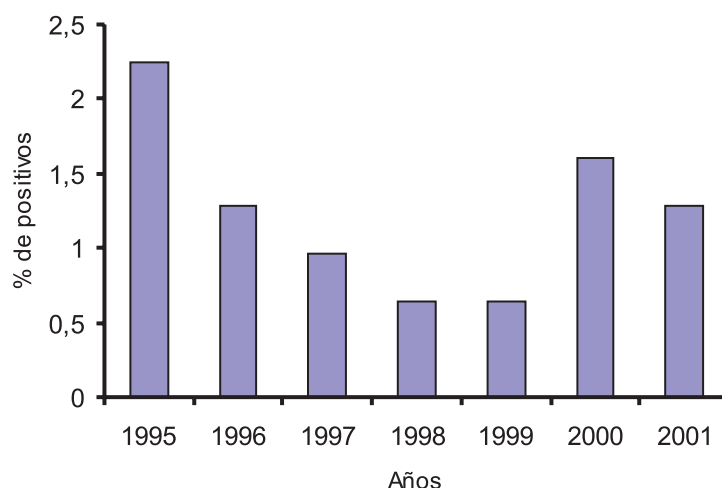


Figura 1.—Seroprevalencia de la paratuberculosis bovina en Asturias





los años investigados, teniendo en cuenta que la prevalencia esperada fue del 28,21%, resultó bastante lineal, aunque se podría señalar una tendencia decreciente del 2,25% hasta el 0,64% en el intervalo 1995-1999, para ascender ligeramente en los años sucesivos.

Los resultados obtenidos por histopatología (Tabla 1) fueron de 85 (44,97%) animales en los que se detectó algún tipo de lesión compatible con paratuberculosis y 104 (55,03%) de animales negativos. Las lesiones encontradas fueron principalmente de tipo focal, consistentes en pequeños granulomas formados por macrófagos en un número que osciló entre cinco y 20. Estos resultados fueron confirmados por PCR e inmunohistoquímica en el 95% y 93% de las muestras analizadas, respectivamente, lo que puso de manifiesto la alta sensibilidad y especificidad de la técnica histopatológica. Los datos obtenidos contrastan con los encontrados por otros autores en España que utilizaron las mismas técnicas, como el caso de Juste y col. (2000), que mediante el uso combinado de técnicas no superaron el 30%, o Garrido y col. (2001), que obtuvieron un 15,4% de positivos por PCR y sólo un 4,7% por histopatología. Fuera de nuestro país las prevalencias encontradas también son muy dispares, dependiendo principalmente de la técnica utilizada, como por ejemplo, en el caso de Holanda que alcanzó el 40% cuando se emplean cultivos bacteriológicos en heces (Kalis *et al.* 1999).

Sorprende la gran diferencia que existe entre los valores de prevalencia obtenidos mediante las técnicas serológicas y las histopatológicas. La explicación habría que buscarla en las diferencias de sensibilidad y especificidad de las técnicas empleadas. La mayoría de los animales positivos por histopatología mostraron lesiones del tipo focal que, aunque no se puede excluir que estén indicando el inicio de la enfermedad, lo más probable es que se trate de animales con formas persistentes de infección por *Map* que han tenido lugar en las primeras semanas de vida, tal como ha sido sugerido en los ovinos (Pérez y col., 1996). El ELISA sólo tiene una buena sensibilidad (87%) en los casos clínicos, en cambio ésta disminuye drásticamente hasta niveles inferiores al 15% cuando se trata de animales subclínicos (Sweeney y col., 1995). En consecuencia, cabe esperar que la prevalencia obtenida por ELISA se refiera en su mayor parte a animales con clínica y consecuentemente eliminadores de *Map*.

Como conclusión, podemos mencionar que la paratuberculosis bovina, analizada mediante técnicas histopatológicas, muestra una alta prevalencia en la región (44,97%), que se correspondería con animales positivos asintomáticos. Mientras que la prevalencia media encontrada por ELISA fue muy inferior (1,23%), pudiendo en este caso tratarse de animales positivos con síntomas y eliminadores de *Map*.

Tabla 1.–Prevalencia de la paratuberculosis bovina en Asturias utilizando las técnicas histopatológicas

Histopatología	Positivos (%)	Negativos (%)	Total
Nº de animales	85 (44,97)	104 (55,03)	189