

**DISCIPLINA: MICROBIOLOGÍA, PARASITOLOGÍA, ENFERMEDADES INFECCIOSAS Y ENFERMEDADES PARASITARIAS**

**DIAGNÓSTICO DE LA PARATUBERCULOSIS BOVINA CON PPD AVIAR: COVARIABLES QUE PUEDEN AFECTAR SU DESEMPEÑO**

ALVARADO PINEDO, M. Fiorella<sup>1</sup>; VACA, Roberto<sup>2</sup>; FERNÁNDEZ, Martín<sup>3</sup>; TUFILLARO, Corina<sup>4</sup>; ROMERO, Magali<sup>5</sup>; ROMANO M. Isabel<sup>6</sup>; TRAVERÍA Gabriel.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> CEDIVE. Centro de Diagnóstico e Investigaciones Veterinarias. FCV. UNLP. Alvear y Salta (7139). Chascomús.

<sup>2</sup> Cátedra de Zootecnia de Bovinos. FCV. UNLP. <sup>3</sup> Becario estudiante de investigación de la FCV. UNLP. <sup>4</sup> Pasante Posgrado CEDIVE. FCV. UNLP. <sup>5</sup> Becaria de Estudio de CIC. Bs. As. <sup>6</sup> INTA Castelar. Bs. As. Argentina.

Email: falvarado@fcv.unlp.edu.ar

**INTRODUCCIÓN.** Medir la respuesta inmune celular retardada puede identificar de manera temprana a aquellos animales infectados con *Mycobacterium avium* subespecie *paratuberculosis* (Map), patógeno responsable de la paratuberculosis bovina (PTBC), una enfermedad crónica caracterizada por ocasionar una ileocolitis granulomatosa difusa, con compromiso de los vasos linfáticos y linfonodos mesentéricos regionales. En los bovinos suele provocar baja de la producción láctea, mala condición corporal y diarrea intermitente que puede llevar a la muerte en el curso de pocos meses. Los animales generalmente manifiestan los signos clínicos a partir de los dos años de edad. Los mecanismos de respuesta inmunológica hacen que esta enfermedad se diagnostique utilizando distintas pruebas de acuerdo a la edad de los animales, pudiéndose evaluar secuencialmente la inmunidad celular, humoral y la eliminación de micobacterias.

Entre las pruebas que miden la inmunidad celular, se encuentran la prueba del gamma interferón, la prueba de linfoproliferación y la prueba tuberculínica. Las dos primeras se realizan a partir de muestras de sangre y deben analizarse en el transcurso de las 24 horas pos extracción en laboratorios especializados. La prueba intradérmica con la PPD Aviar, es una técnica sencilla y aplicable a campo, que puede ayudar a determinar si un animal ha sido infectado por el Map. La respuesta se manifiesta a las 72 horas de realizada la inoculación intradérmica del antígeno y la reacción se reconoce por una tumefacción en el sitio de aplicación.

En este trabajo se estudió el grado de influencia sobre el poder discriminatorio de la prueba intradérmica con PPD Aviar de los siguientes factores (covariables): número e intervalo de las aplicaciones, edad al momento de aplicación y prevalencia de PTBC.

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

**1. Establecimientos y animales:** En un lapso de tiempo de aproximadamente 5 años, se trabajó con un total de 468 animales de dos tambos y un rodeo de cría bovina, todos ubicados en la provincia de Buenos Aires. El *Rodeo lechero A* (RLA) se encuentra en la ciudad de Tandil y presentó antecedentes de casos clínicos diagnosticados como PTBC con una prevalencia real del 30%. El *Rodeo lechero B* (RLB) está en la ciudad de Chascomús y posee una prevalencia real del 7%. El *Rodeo de cría* fue considerado negativo a la paratuberculosis (RNEG) y se ubica en Coronel Suárez. En todos los rodeos se realizaron aplicaciones de tuberculina aviar a animales de entre 1 mes y hasta 9 años de vida. A partir de los 18 meses de edad se realizaron muestreos de materia fecal para confirmar la infección por Map.

**2. Tuberculinización:** En todos los rodeos se efectuaron aplicaciones intradérmicas de PPD Aviar con Tuberculina DPP (Derivado Proteico Purificado) Aviar del DILAB, con una concentración de 0,5 mg/mL. Las aplicaciones se realizaron en el pliegue anocaudal interno o el tercio medio de la tabla del cuello; en todos los casos se inyectó 0,1 ml de volumen utilizando una jeringa semiautomática McLintock de Bar Knight (Gran Bretaña). Se realizó la medida del pliegue cutáneo previo al momento de la inoculación y en el momento de la lectura a las 72 hs utilizando un calibre (Torres, 2000). Se consideraron animales reactantes a aquellos que presentaron una diferencia en la medición del pliegue cutáneo > 0 mm.

**3. Cultivo:** Las muestras de materia fecal se sembraron en medios de cultivo de Herrold con micobactina y se siguió el protocolo de descontaminación y siembra sugerido por Whitlock y col. (1991 y 2000). Las muestras se incubaron a 37°C durante 6 meses.

**4. Análisis estadístico:** Se utilizó la prueba de ROC con el programa MedCalc® y el paquete estadístico ROCRegression. Las covariables estudiadas fueron número de aplicaciones, intervalo

entre aplicaciones, la prevalencia de PTBC en el rodeo y la edad de los animales al momento de la aplicación intradérmica de la PPD Aviar.

**RESULTADOS.** Los resultados totales de los cultivos y de las pruebas intradérmicas se presentan en la Tabla 1. A partir de estos hallazgos se calculó con la prueba de ROC la mayor sensibilidad (69%) y especificidad (86,2%) a un punto de corte en la diferencia de pliegues cutáneos en la prueba tuberculínica con PPD Aviar >0 mm. Con un LR+ de 5 y un LR- de 0,36. El AUC fue de 0.777, el IC 95% de 0.731 a 0.819 y el valor de P= 0.0001.

**Tabla 1.** Resultados totales de los cultivos de materia fecal en todos los animales que recibieron la aplicación intradérmica de la PPD Aviar.

Estado sanitario	+ PPD Aviar	- PPD Aviar	Total
Enfermos (cultivo + Map)	57	28	85
No enfermos (cultivo – Map)	77	306	383
Total	134	306	468

Al estudiar las covariables con el programa ROCRegression, para determinar el grado de influencia que ejercen sobre el desempeño de la prueba intradérmica con PPD Aviar, se compararon las distintas AUC y logramos ordenarlas de mayor a menor influencia de la siguiente manera: intervalo entre aplicaciones, número de aplicaciones, la edad de los animales al momento de la aplicación intradérmica y la prevalencia de paratuberculosis en el rodeo. Así, la mayor diferencia en el AUC se encontró al inyectar la tuberculina aviar cada 3 meses, repitiendo las aplicaciones más de 3 veces, realizando las inoculaciones en animales de promedio 20 meses de edad, considerando que a mayor edad menor respuesta en la prueba intradérmica; y finalmente, con mejores resultados en rodeos de mayor prevalencia a PTBC, en este trabajo el RLA.

**DISCUSIÓN.** En trabajos previos de nuestro grupo se ha podido confirmar la asociación entre la presencia de reactantes a la PPD Aviar y la posterior eliminación de Map por materia fecal. Esta observación concuerda con la descripción de la patogenia de la PTBC, y como a medida que aumenta la edad del animal infectado, disminuye la inmunidad celular, detectable por la prueba intradérmica, para dar luego lugar a la inmunidad de tipo humoral, y la manifestación de los signos clínicos (Chiodini, 1984; Clarke 1997; OIE, 2014). En el presente estudio, se observó que diferentes covariables pueden influir y mejorar los resultados de la prueba intradérmica con tuberculina aviar; los análisis con programas estadísticos, como el ROCRegression, permitieron estimar, en una enfermedad de curso crónico, el grado de influencia que presentaron las covariables en el desempeño de esta prueba diagnóstica.

#### CONCLUSIONES.

- ❖ La sensibilidad de la prueba intradérmica con PPD Aviar aumenta al repetir las aplicaciones (se sugiere entre 3 a 5 repeticiones).
- ❖ Se recomienda un intervalo de aplicación de tuberculina no superior a los tres meses para evitar omitir la detección de animales reactantes.
- ❖ Se sugiere realizar una primera aplicación de PPD Aviar a bovinos de diferentes edades, para calcular, de acuerdo al rodeo, el mejor rango de edad para hallar a los reactantes.
- ❖ En rodeos con alta prevalencia de la PTBC se pueden detectar de manera más temprana, a los infectados con Map utilizando la aplicación protocolizada de la PPD Aviar.

#### BIBLIOGRAFÍA

1. Kalis CHJ, Collins MT, Hesselink JW, Barkema HW. Specificity of two tests for early diagnosis of bovine paratuberculosis based on cell-mediated immunity: the Johnin skin test and the gamma interferon assay. *Veterinary Microbiology* 2003; 97: 73-86.
2. Torres, P. Pruebas tuberculínicas (inoculación, lectura e interpretación). Preguntas y respuestas. SAGPyA, SENASA, OPS/OMS. 2000.
3. Ian A. Gardner, Wasley O. Johnson. Bayesian Epidemiologic Screening Techniques. [www.epi.ucdavis.edu/diagnostictests/index.html](http://www.epi.ucdavis.edu/diagnostictests/index.html).