

Paratuberculosis bovina: asociación entre el índice de urea y la densidad óptica del suero en la técnica de Elisa indirecta

Bovine paratuberculosis: association between the urea index and the optical density of serum in the indirect Elisa technique

DOI: 10.34188/bjaerv4n1-105

Recebimento dos originais: 20/11/2020

Aceitação para publicação: 20/12/2020

Leandro Adrián Di Paolo

Médico veterinario. Doctorando en Ciencia veterinarias. Profesor coordinador del curso de clínica y sanidad de los rumiantes. Profesor adjunto del curso de enfermedades de los rumiantes y cerdos. Responsable del área de patología del Centro de Diagnóstico e Investigaciones Veterinarias (CEDIVE).

Institución: Universidad Nacional de La Plata / Lugar de trabajo FCV-CEDIVE

Dirección: Alvear, 803 – Ciudad: Chascomús – Buenos Aires, Argentina.

Correo electrónico: ladipaolo@fcv.unlp.edu.ar

Pedro Sebastián Sosa

Doctorando en Ciencias veterinarias por la Universidad Nacional de La Plata / Facultad de Ciencias Veterinarias / Instituto CEDIVE

Institución: Universidad Nacional de La Plata / Lugar de trabajo FCV-CEDIVE

Dirección: Alvear, 803 – Ciudad: Chascomús – Buenos Aires, Argentina.

Correo electrónico: pedrososa041@gmail.com

María Fiorella Alvarado Pinedo

Doctorada en Ciencias Veterinarias por la Universidad Nacional de La Plata (UNLP)

Institución: Universidad Nacional de La Plata / Lugar de trabajo FCV-CEDIVE

Dirección: Alvear, 803 – Ciudad: Chascomús – Buenos Aires, Argentina.

Correo electrónico: falvarado@fcv.unlp.edu.ar

Magali Andrea Romero

Doctorada en Ciencias Veterinarias por la Universidad Nacional de La Plata (UNLP)

Institución: Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), Centro de Diagnóstico e Investigaciones Veterinarias (CEDIVE).

Dirección: Alvear n° 803, Chascomús, Buenos Aires, Argentina.

Correo electrónico: magaliandrea.romero@yahoo.com.ar

Luis María Peralta

Doctorando en Ciencias veterinarias por la Universidad Nacional de La Plata / Facultad de Ciencias Veterinarias / Instituto CEDIVE

Institución: Universidad Nacional de La Plata / Lugar de trabajo FCV-CEDIVE

Dirección: Alvear, 803 – Ciudad: Chascomús – Buenos Aires, Argentina.

Correo electrónico: luismaperaltavet@gmail.com

Gabriel Eduardo Travería

Doctorado en Ciencias Veterinarias por la Universidad Nacional de La Plata (UNLP)

Institución: Universidad Nacional de La Plata / Lugar de trabajo FCV-CEDIVE

Dirección: Alvear, 803 – Ciudad: Chascomús – Buenos Aires, Argentina.
Correo electrónico: traveria@fcv.unlp.edu.ar

RESUMEN

El presente trabajo analiza las asociaciones observadas entre las densidades ópticas de las muestras de sueros analizados por la técnica de ELISA indirecto para el diagnóstico de paratuberculosis bovina, con el denominado índice urea, el cual se obtiene de comparar las densidades ópticas de sueros expuestos y no expuestos a dicha sustancia. Se analizaron 592 muestras de sueros de tres establecimientos ganaderos, dos dedicados a la producción de carne y uno de leche, ubicados en la Provincia de Buenos Aires, Argentina. En todos los casos se halló correlación positiva entre las variables. Se discute el uso del índice urea como mejorador de la especificidad del ELISA convencional.

Palabras clave: Paratuberculosis bovina, diagnóstico serológico, Elisa indirecto, densidad óptica.

ABSTRACT

This paper analyzes the associations observed between the optical densities of the serum samples analyzed by the indirect ELISA technique for the diagnosis of bovine paratuberculosis, with the so-called urea index, which is obtained from comparing the optical densities of exposed and unexposed sera said substance. 592 bovine serum samples belonging to two beef herds and one dairy herds were analyzed, located in the Province of Buenos Aires, Argentina. In all cases, a positive correlation was found between the variables. The use of the urea index as an enhancer of the specificity of the conventional ELISA is discussed.

Key words: Johne's disease, serological diagnosis, urea ELISA, optical density.

1 INTRODUCCIÓN

La paratuberculosis (PTB) es una enfermedad consuntiva crónica de los rumiantes. Los bovinos se infectan desde terneros, cuando ingieren el *Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis* (MAP). El período de incubación es extremadamente largo (entre 2 y 8 años), y culmina cuando se observa pérdida de peso, edema submandibular y diarrea profusa incoercible, que generalmente lleva a la muerte. Los estadios asintomáticos (subclínicos) pueden durar varios años, y son un verdadero desafío desde el punto de vista del diagnóstico. Este se puede realizar a partir del cultivo bacteriológico de muestras de materia fecal (MF), intestino, linfonodos, etc. Las colonias son visibles a partir de las 6 semanas y el dar negativa la muestra demanda hasta 6 meses. Las pruebas serológicas como la inmunodifusión en gel de agar (AGID) y la prueba de ELISA se utilizan regularmente como métodos serológicos indirectos complementarios al cultivo. El ELISA presenta una buena sensibilidad cuando se utiliza en rodeos endémicos, pero en algunos casos la especificidad puede verse afectada por la presencia de anticuerpos inespecíficos o de baja avidéz en el suero. La urea afecta los enlaces de hidrógeno desestabilizando las fuerzas hidrófobas que actúan

en la unión antígeno-anticuerpo, las uniones débiles se desprenden, quedando unidas las que tienen mayor afinidad funcional (avidez). Esta se incrementa con el tiempo después del contacto inicial con el patógeno, y se relaciona con la cronicidad de la infección. El objetivo de este trabajo fue correlacionar la índice urea (IU) con la densidad óptica (DO) en la prueba de Elisa.

2 MATERIAL Y MÉTODOS

Se trabajó con 592 muestras de suero provenientes de tres establecimientos ganaderos comerciales, dos de cría (Est. A y Est. B) y un tambo (Est. C). Los rodeos A y B se sangraron en su totalidad, mientras que en el C las muestras fueron de una fracción de las vacas en ordeño. A los animales positivos a ELISA se les extrajo MF del recto para cultivo bacteriológico. Todos los sueros se sometieron al test de ELISA indirecto sembrados por duplicado, uno sin y otro con exposición a la urea, esta se utilizó a una concentración de 8 M, durante 4 minutos antes de agregar el conjugado y continuar con el protocolo de la prueba. Se utilizó antígeno de *M. avium subsp. Avium* lisado a 40 kpsi en un disruptor celular. Al realizar la lectura de las DO se calculó el IU de cada muestra con la siguiente fórmula: Índice urea= (DO suero con urea /DO suero sin urea) x 100. Con los resultados obtenidos se realizó, en primera instancia, la cuantificación de la seroprevalencia, luego una regresión lineal para establecer la correlación entre el IU y la DO, y finalmente se realizó un test de anova simple (Statgraphics®) comparando los grupos positivos y negativos en base al valor de DO del ELISA urea, con el objetivo de hallar diferencias significativas en relación a los IU entre ambos. Las muestras de MF se sembraron en medio de cultivo líquido para micobacterias (Romero y col, 2018. <https://revistas.unlp.edu.ar/analecta>).

3 RESULTADOS

Las seroprevalencias determinadas fueron del 3,2 % para el Est. A (n=214), 3,4 % para el Est. B (n=287) y 16,4 % para el Est. C (n=91). El coeficiente de correlación entre las variables IU y DO fue de 0,76 (R-cuadrada = 58,5%), 0,14 (R-cuadrada = 1,96 %) y 0,70 (R-cuadrada = 50,02%) respectivamente para los tres establecimientos. El análisis de varianza para detectar diferencias entre grupos positivos y negativos, con una $p < 0,05$ ($p = 0,0001$) mostró diferencias estadísticamente significativas para los tres establecimientos analizados. Posteriormente se hizo una prueba post-hoc (LSD de Fisher) observándose que en todos los casos el grupo positivo presentó la índice urea más elevado que el negativo. Los cultivos de MF procesados hasta el momento fueron positivos a PTBC en el 21,8% de las muestras.

4 DISCUSIÓN Y CONCLUSIÓN

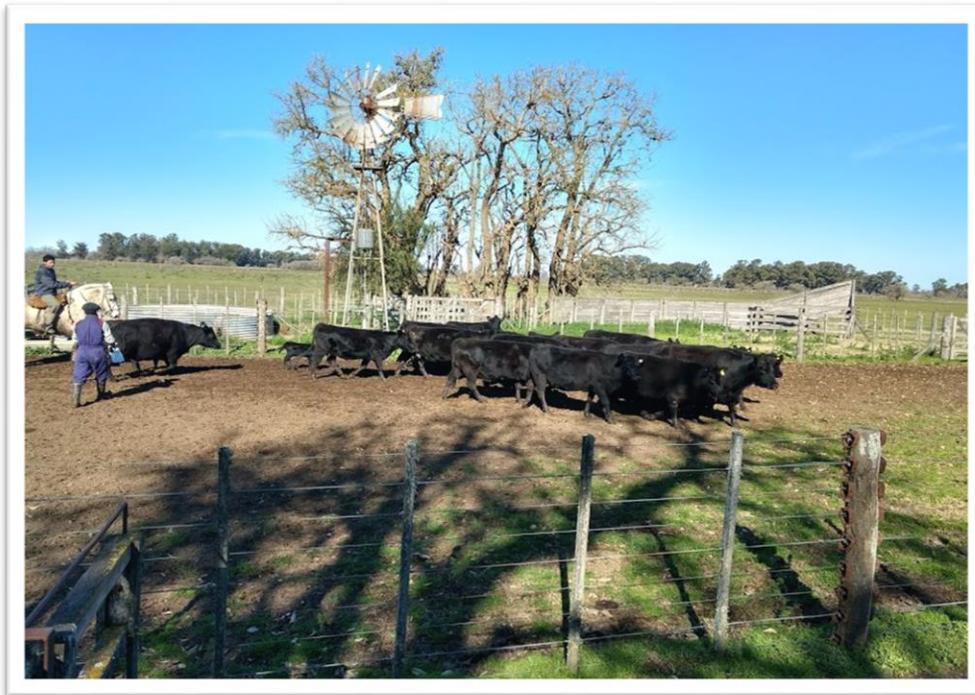
Las seroprevalencias halladas están en concordancia con las observadas por otros autores (Alvarado Pinedo y col, 2018) en la región, siendo mayor en el establecimiento tambero que en los de cría. La asociación entre las variables IU y DO mostró una correlación positiva alta en los Est. A y C; mientras que en el Est. B la asociación fue positiva muy baja. En los tres casos se hallaron diferencias significativas ($p=0,0001$) entre los grupos positivo y negativo. El IU podría utilizarse, a futuro, como indicador de especificidad de los sueros para PTB en los rodeos endémicos para así focalizar el seguimiento de los animales que muestren sueros con alta avidéz. Los animales diagnosticados positivos al ELISA urea y con IU alto podrían ser infectados crónicos, próximos a manifestar signos clínicos; mientras que, los animales negativos al ELISA urea, pero con IU alto podrían ser futuros enfermos, debido a que ya poseen anticuerpos con alta avidéz. La identificación y el seguimiento de ambos grupos podría tener implicancias sanitarias importantes en el control de la PTB.

REFERENCIAS

- 1-Alvarado Pinedo MF, Sosa P, Di Paolo LA, Romero M, Peralta LM, Travería GE, Moyano D, Jaureguiberry M, Romano M. ELISA urea in the diagnosis of paratuberculosis: estimation of seroprevalence in some localities of Buenos Aires province, Argentina. 14th International Colloquium on Paratuberculosis. 4-8 June 2018. Rivera Maya México. Abstracts programme ICP 2018. Page 72.
- 2- Di Paolo LA, Alvarado Pinedo MF, Peralta LM, Romero MA, Travería GE. Paratuberculosis bovina: diagnóstico serológico con un Elisa urea para intentar categorizar el estadio de la enfermedad. XXI Reunión Científico Técnica de la Asociación Argentina de Veterinarios de Laboratorio de Diagnóstico (AAVLD). Fecha 6,7 y 8 de octubre de 2016. Jujuy, Argentina.
- 3-Lau L, Green AM, Balmaseda A, Harris E Antibody avidity following secondary dengue virus type 2 infection across a range of disease severity. *J Clin Virol.* 2015 Aug;69:63-7.
- 4-Nagao-Dias AT, Almeida TL, Oliveira Mde F, Santos RC, Lima AL, Brasil M. Salivary anti-PGL IgM and IgA titers and serum antibody IgG titers and avidities in leprosy patients and their correlation with time of infection and antigen exposure *Braz J Infect Dis.* 2007 Apr;11(2):215-9.
- 5-Travería GE. 2003. Análisis antigénico del *Mycobacterium paratuberculosis* y diagnóstico de la paratuberculosis bovina mediante enzimo inmuno ensayo (ELISA). Tesis doctoral Universidad Nacional de La Plata.

ANEXO I - Fotos y gráficos

Rodeo "A". Seroprevalencia a PTBC 3,2% (n°=214).



El gráfico 1 muestra la correlación entre las variables IU y DO, que fue de 0,76.

Gráfico del Modelo Ajustado
 $IU = 42,2329 + 0,0504062 * DO$

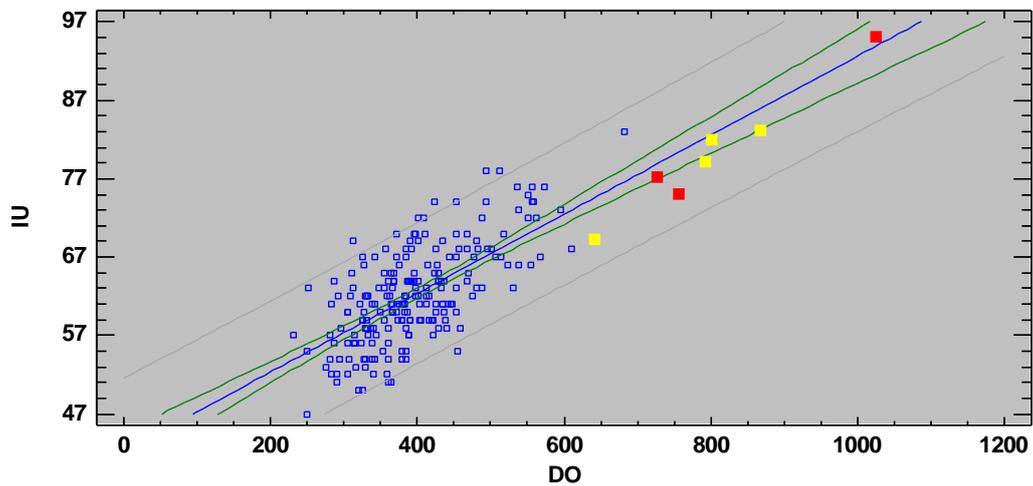
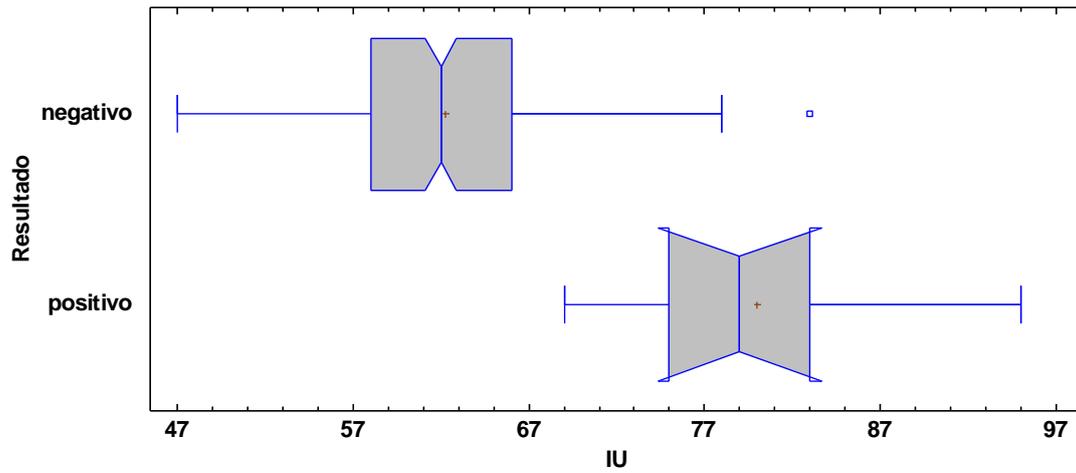
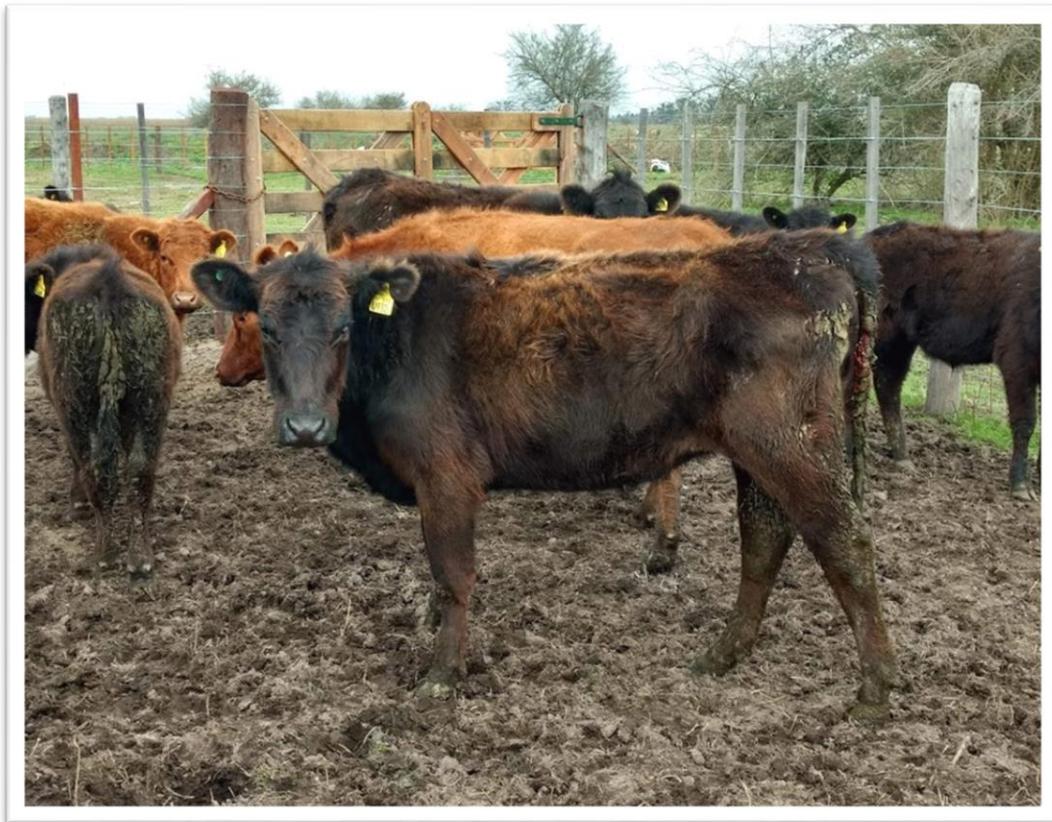


Gráfico 1. Referencias: ■ Elisa+, Cultivo+
■ Elisa+
■ Elisa-

El gráfico de caja y bigote muestra la diferencia entre grupos positivo y negativo.



Rodeo "B". Seroprevalencia a PTBC 3,4 % (n°=287).



Descripción de la imagen: Animal con signos clínicos de PTBC avanzada. Delgadez, pérdida de peso y diarrea.

El gráfico 2 muestra la correlación entre las variables IU y DO, que fue 0,14.

Gráfico del Modelo Ajustado
 $IU = 57,5499 + 0,0160479 \cdot DO$

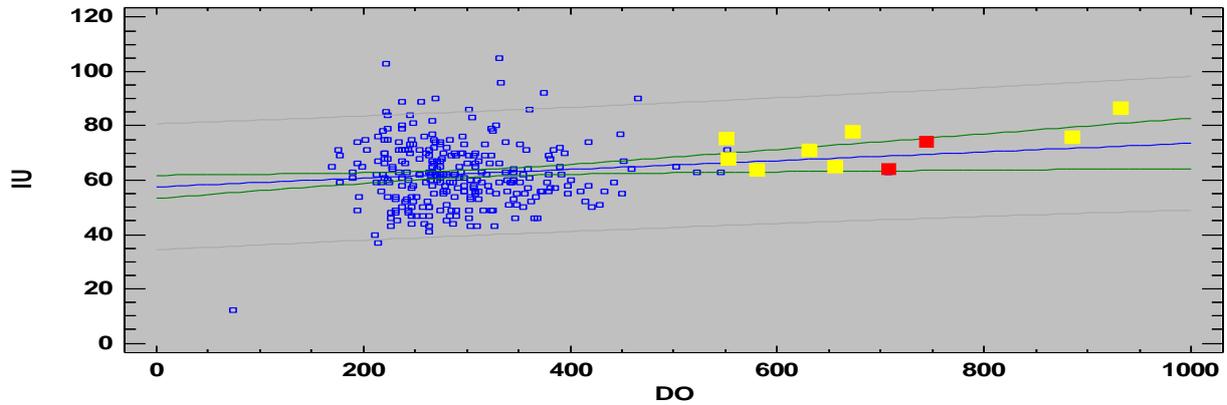
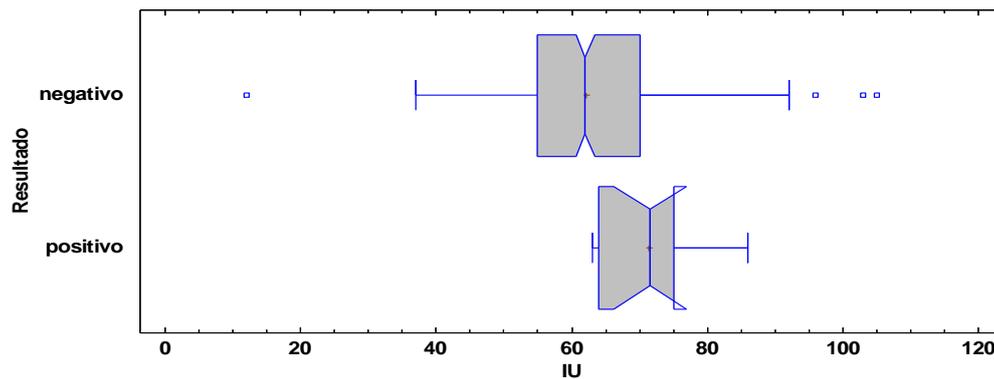
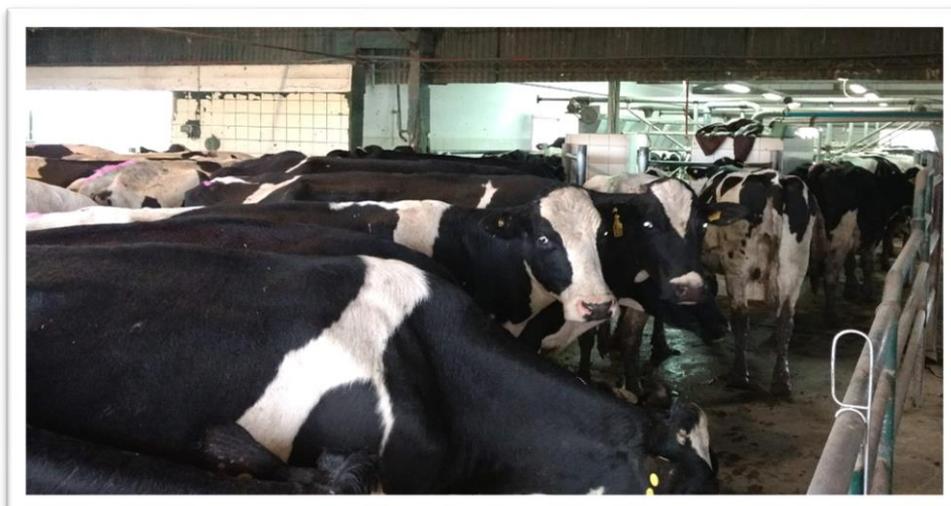


Gráfico 2. Referencias: ■ Elisa+, Cultivo+
■ Elisa+
■ Elisa-

El gráfico de caja y bigote muestra la diferencia entre grupos positivo y negativo.



Rodeo “C”. Seroprevalencia a PTBC 16,4 % (n°=91).



El gráfico 3 muestra la correlación entre las variables IU y DO, que fue 0,70.

Gráfico del Modelo Ajustado
 $IU = 46,6191 + 0,0600235 \cdot DO$

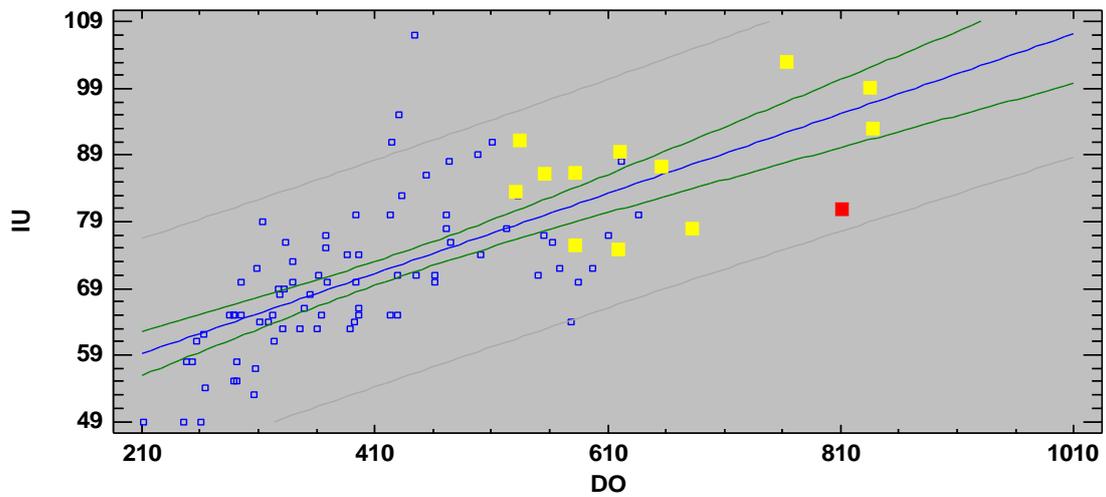


Gráfico 2. Referencias: ■ Elisa+, Cultivo+

- Elisa+
- Elisa-

El gráfico de caja y bigote muestra la diferencia entre grupos positivo y negativo.

