



**X Congreso Latinoamericano de Buiatría  
XXX Jornadas Uruguayas de Buiatría**

**VENTAJA DEL USO SIMULTÁNEO DEL EXAMEN BACTERIOLÓGICO DE FECAS Y LA PRUEBA DE ELISA EN EL DIAGNÓSTICO DE PARATUBERCULOSIS BOVINA EN ANIMALES CON INFECCIÓN SUBCLÍNICA.**

*Juan Kruze, MV, PhD; Juan Pablo Soto, MV; Sergio Leiva, BM, MSc*

Instituto de Microbiología, Universidad Austral de Chile,  
Casilla 167, Valdivia, Chile (jkruze@uach.cl)

**RESUMEN**

La Paratuberculosis (Enfermedad de Johne) es una enfermedad crónica e incurable causada por *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* que afecta el intestino de todos los rumiantes, incluyendo especies silvestres, y que produce cuantiosas pérdidas económicas, especialmente en los rebaños bovinos de leche (Gilmour, 1985; Hutchinson, 1996). Aunque desestimada por muchos, es una enfermedad de alta prevalencia en muchos países y cuya principal característica es el carácter subclínico de los animales infectados, dificultando el diagnóstico y control en los rebaños infectados (Whitlock & Buergeit, 1996; Collins, 1999). En los últimos años, la Paratuberculosis ha adquirido especial relevancia epidemiológica en Salud Pública por su estrecha relación con la Enfermedad de Crohn, enfermedad del hombre clínicamente muy semejante a la Paratuberculosis y que ha sido asociada a infecciones con *M. avium* subsp. *paratuberculosis* (Chiodini & Rossiter, 1996; Collins, 1997).

La base del control y erradicación de la enfermedad es el diagnóstico y eliminación de los animales infectados. Sin embargo, aunque existen numerosas alternativas de diagnóstico, ningún método actualmente disponible es capaz de detectar a todos los animales infectados. El cultivo de fecas, aunque es altamente específico, tiene una baja sensibilidad debido a la excreción intermitente del agente por las fecas. La prueba serológica de ELISA ha sido introducida en los últimos años como una nueva alternativa de diagnóstico, más rápida y de menor costo, pero poco sensible para detectar infección en animales jóvenes, debido a la aparición tardía de los anticuerpos séricos, generalmente poco antes de la aparición de los síntomas clínicos (Collins, 1997).

El objetivo del presente trabajo fue comparar el cultivo de fecas y el examen microscópico directo con una prueba de ELISA en muestras recolectadas simultáneamente de 250 animales clínicamente sanos provenientes de 14 rebaños lecheros infectados del sur de Chile (Xª Región). Las muestras de fecas fueron examinadas directamente mediante el método de Ziehl Neelsen (Carter, 1990) y simultáneamente cultivadas en Medio de Herrold Modificado con yema de huevo y micobactina J utilizando como descontaminante cloruro de hexadecilpiridinium (HPC) y una solución antibiótica conteniendo amfotericina B, vancomicina y ácido

nalidixico, según el procedimiento descrito por Kruze et al. (2000). La identificación de las cepas aisladas se realizó mediante la técnica de PCR utilizando partidores específicos para *M. avium* subsp. *paratuberculosis* (IS900). Para el diagnóstico serológico se utilizó un kit comercial de ELISA (IDEXX Labs, USA), empleando un lector fotométrico a 620 nm y un punto de corte de DO 0.25. Para establecer la concordancia entre pruebas se utilizó la prueba de kappa (Martín et al., 1997), y para determinar la sensibilidad y especificidad de las pruebas se utilizó el programa Win Episcope 2.0.

El 16.0% (40) de las muestras de fecas resultaron positivas al cultivo aislándose el agente etiológico en 10 (71.4%) de los rebaños examinados. Por el contrario, en ninguna de las muestras de fecas fue posible observar la morfología típica del agente al examen microscópico directo (tinción de Ziehl Neelsen), registrándose sólo resultados sospechosos en 35 muestras (14.0%), de las cuales sólo 6 fueron simultáneamente positivas al cultivo. La sensibilidad del examen microscópico directo fue de 15.0% y la especificidad de 86.2% con una nula concordancia entre ambos métodos ( $\kappa = 0.013$ ) (Cuadro 1). La prueba de ELISA fue capaz de detectar uno o más animales reaccionantes en 9 (64.3%) de los rebaños examinados con sólo 20 (8.0%) animales reaccionantes positivos. Esta prueba resultó altamente específica (96.7%) pero poco sensible (32.5%) para detectar animales subclínicamente infectados pero con una mediana concordancia con el cultivo ( $\kappa = 0.366$ ) (Cuadro 2).

**Cuadro 1** Relación entre cultivo fecal y método de Ziehl Neelsen\*

Z.N. *	Cultivo de fecas		Total
	+	-	
+/-	6 <sup>a</sup>	29 <sup>b</sup>	35
-	34 <sup>c</sup>	181 <sup>d</sup>	215
<b>Total</b>	40	210	250
Sensibilidad : $a / (a+c) \times 100 = 15.0\%$			
Especificidad : $d / (b+d) \times 100 = 86.2\%$			
Concordancia : $\kappa = 0.013$			

**Cuadro 2** Relación entre cultivo fecal y prueba de ELISA

ELISA	Cultivo de fecas		Total
	+	-	
+	13 <sup>a</sup>	7 <sup>b</sup>	20
-	27 <sup>c</sup>	203 <sup>d</sup>	230
<b>Total</b>	40	210	250
Sensibilidad : $a / (a+c) \times 100 = 32.5\%$			
Especificidad : $d / (b+d) \times 100 = 96.7\%$			
Concordancia : $\kappa = 0.366$			



Los resultados obtenidos concuerdan con otros autores en el sentido que la prueba de ELISA tiene muy baja sensibilidad para detectar animales asintomáticos debido a la aparición tardía de los anticuerpos circulantes, con una sensibilidad promedio de 45% (Sweeney et al., 1995; Whitlock et al., 2000) y que el examen microscópico directo de fecas en la mayoría de los casos arroja resultados falsos positivos (Zimmer et al., 1999). Por su parte, el cultivo de fecas permite detectar infecciones tempranas ya que el agente se elimina por las fecas, aunque en forma intermitente, algunas semanas posterior a la infección y la sensibilidad va a depender de la cantidad de micobacterias excretadas y del procedimiento bacteriológico empleado tanto para descontaminar las muestras previo al cultivo como de la capacidad del medio para permitir el crecimiento del agente (Stabel, 1997, Wihllock et al., 2000).

Considerando que el éxito de un programa de control de Paratuberculosis bovina se basa en la detección del mayor número de animales infectados, estos resultados demuestran claramente la necesidad de utilizar simultáneamente más de un método de diagnóstico, particularmente cultivo y serología, aumentando la sensibilidad total. Por otra parte, este estudio también demuestra que el examen microscópico directo de fecas, aunque es un examen rápido y de bajo costo, no debe usarse para el diagnóstico de la enfermedad en animales asintomáticos.

#### SUMMARY

Paratuberculosis (Johne's Disease) is a chronic, non-curable infectious disease caused by *Mycobacterium avium* subsp *paratuberculosis* affecting the intestine of all ruminants, including wild animals, producing great economic losses especially in dairy cattle (Gilmour, 1985; Hutchinson, 1996). Although many dairy farmers are not aware of the disease it has a high prevalence in many countries worldwide and the main feature of the disease is that infected animals show no clinical symptoms impairing diagnosis and control in infected herds (Whitlock & Buergelt, 1996; Collins, 1999). Bovine Paratuberculosis has been of increased interest in Public Health during the last years because its close relationship with Crohn Disease, also a chronic, non-curable disease of the intestine of man from which *M.avium* subsp *paratuberculosis* has been isolated in many cases (Chiodini & Rossiter, 1996; Collins, 1997).

Paratuberculosis control and eradication programs are based upon diagnosis and culling of infected animals. However, although a number of diagnostic methods are currently available, there is no single test able to detect all infected animals and the use of more than one test simultaneously has been strongly recommended to improve the rate of detection. Faecal culture has been shown to be a highly specific method but with a low

sensitivity as the etiological agent is intermittently excreted through the faeces. The ELISA test has been recently introduced as a new, quicker and cheaper diagnostic test, but it has a low sensitivity to detect asymptomatic infected animals less than one year old (Collins, 1997).

The aim of this study was to compare bacteriological (faecal culture and direct microscopic examination) and serological (ELISA) tests using faecal and blood samples collected simultaneously from 250 asymptomatic animals in 14 infected dairy herds in southern Chile (X<sup>th</sup> Region). All faecal samples were examined directly (Ziehl Neelsen technique) (Carter, 1990) and cultured on slant Modified Herrold's Medium with egg yolk and micobactin J; hexadecyldipiridium chloride (HPC) and an antibiotic solution (amphotericin B, vancomycin and nalidixic acid) were used as decontaminants previous to culture according to Kruze et al, 2000). The identification of isolated strains was done by PCR technology using the specific insertion IS900 for *M.avium* subsp *paratuberculosis*. A commercial ELISA kit (IDEXX Labs., USA) and a photometric reader at 620 nm and a cut off of DO 025 were used for the serological diagnosis. Agreement between tests was calculated with kappa value (Martín et al., 1997) and sensitivity and specificity values were calculated by means of the computer Win Episcopy program.

*M.avium* subsp *paratuberculosis* was isolated in 16.0% (40) and 71.4% (10) of animals and herds examined, respectively. The direct microscopic examination test failed to show the typical morphology of the agent and 35 (14.0%) smears were recorded as a suspicious result of which only 6 had also a culture positive result. There was no agreement between faecal culture and Ziehl Neelsen ( $\kappa = 0.013$ ) and the sensitivity and specificity of this test were 15.0% and 86.2%, respectively (Table 1). The ELISA test detected one or more positive reactor animal in 9 (64.3%) herds with a total of 20 (8.0%) positive reactor animals. This test was found to be highly specific (96.7%) but with low sensitivity (32.5%) to detect subclinically infected animals and it showed a moderate agreement with faecal culture ( $\kappa = 0.366$ ) (Table 2).

These results confirm that the ELISA test has a low sensitivity to detect asymptomatic animals as serum antibodies appear only prior to development of clinical signs with an average sensitivity of 45% (Sweeney et al., 1995; Whitlock et al., 2000). This study also shows that the direct microscopic examination of faeces in most cases gives false positive results which has also been reported elsewhere (Zimmer et al, 1999). On the other hand, the faecal culture has the advantage of being able to detect infection in young animals soon after infection despite the intermittent excretion of the organism; the sensitivity of faecal culture will depend on the amount of bacteria present in the faeces and on the bacteriological procedure employed both for decontamination and growth conditions (Stabel, 1997, Wihllock et al., 2000).



**X Congreso Latinoamericano de Buiatría  
XXX Jornadas Uruguayas de Buiatría**

Taking into consideration that the success of any control program of bovine Paratuberculosis relies mainly on the detection of all infected animals in a given herd, the results reported here clearly show the usefulness of using simultaneously more than one diagnostic method, in particular faecal culture and serology, increasing overall sensitivity. Finally, this study also shows that the direct microscopic examination of faeces should not be used to diagnose the disease in asymptomatic animals, even it is quicker and cheaper than other tests.

---

---

**REFERENCIAS**

---

---

1. CARTER, G.R. 1990. Staining procedures. En: Diagnostic procedures in veterinary bacteriology and mycology. G.R.Carter & J.R.Cole (eds.), 5<sup>th</sup> ed., Ed. Academic Press, Inc., San Diego, USA. pp. 620
2. COLLINS, M.T. 1997. Symposium: On-farm food safety. Mycobacterium paratuberculosis: a potential food-borne pathogen? *J. Dairy Sci.* 80: 3445-3448.
3. COLLINS, M.T. 1999. Johne's Disease for busy veterinarians. School of Veterinary Medicine, University of Wisconsin, Madison, USA. pp. 6.
4. CHIODINI, R.J.; C.A. ROSSITER. 1996. Paratuberculosis: a potential zoonosis? *Vet.Clin. North Amer.Food Anim.Pract.* 12: 457-467.
5. GILMOUR, N.J.L. 1985. Mycobacterium paratuberculosis. En: *Handbuch der Bakteriellen Infektionen bei Tieren.* Tomo V. H.Blobel & T.Schlisser (eds.). Ed. Gustav Fisher, Jena, Alemania. pp. 658.
6. HUTCHINSON, L.J. 1996. Economic impact of Paratuberculosis. *Vet.Clin.North Amer.Food Anim.Pract.* 12: 373-381.
7. KRUIZE, J.; J.P. SOTO; S. LEIVA. 2000. Aislamiento de Mycobacterium paratuberculosis de fecas de rebaños lecheros infectados mediante el método de Cornell modificado. *Proc. XXII Congreso Chileno de Microbiología, Punta de Tralca, Chile.* p. 56.
8. MARTÍN, S.W.; A.H. MEEK; P. WILLERB. 1987. *Veterinary Epidemiology*, Iowa State University Press, Ames, Iowa, USA. pp. 343.
9. STABEL, J.R. 1997. An improved method for cultivation of Mycobacterium paratuberculosis from bovine fecal samples and comparison to three other methods. *J. Vet.Diagn.Invest.* 9: 375-380.
10. SWEENEY, R.W.; R.H. WITHLOCK; C.L. BUCKLEY; P.A. SPENCER. 1995. Evaluation of a commercial enzyme-linked immunosorbent assay for the diagnosis of Paratuberculosis in dairy cattle. *J.Vet Diagn Invest.* 7: 488-493.
11. WHITLOCK, R.H.; C. BUERGELT. 1996. Preclinical and clinical manifestations of Paratuberculosis. *Vet.Clin.North Amer Food Anim.Pract.* 12: 345-356.
12. WITHLOCK, R.H.; S.J. WELLS; R.H. SWEENEY; J. VAN TIEM. 2000. ELISA and fecal culture for Paratuberculosis (Johne's Disease): sensitivity and specificity of each method. *Vet.Microbiol.* 77: 387-398.
13. ZIMMER, K.; K.G. DRAGER; W. KLAWONN; R.G. HESS. 1999. Contribution to the diagnosis of Johne's Disease in cattle. Comparative studies on the validity of Ziehl Neelsen staining, fecal culture and commercially available DNA-probe test in detecting Mycobacterium paratuberculosis in faeces from cattle. *J.Vet.Med.* 46: 137-140.