

XXIV SIMPOSIO  
2019

PAMPLONA



## Diagnóstico precoz de la paratuberculosis bovina mediante ELISAs basados en la detección de biomarcadores proteicos

**Blanco-Vázquez C.,** Alonso-Hearn M., Juste R., Balseiro A., Iglesias N., Copano F., Amado J., Canive M., Casais R.

**SERIDA**, Servicio Regional de Investigación y Desarrollo Agroalimentario de Asturias; **LSAPA**, Laboratorio de Sanidad Animal del Principado de Asturias; **Universidad de León**; **NEIKER**- Instituto Vasco de Investigación y Desarrollo Agrario.



# PARATUBERCULOSIS (PTB)

*Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (MAP).

Enteropatía crónica muy contagiosa.

Distribución mundial.

Asturias (2017): 25% / 1,9%

Graves pérdidas económicas.

Amplio espectro de formas:

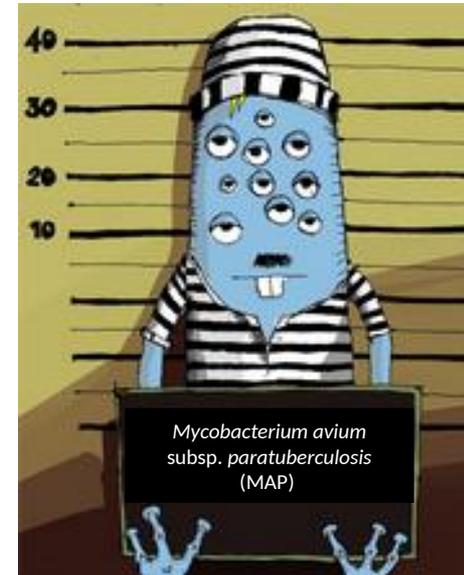
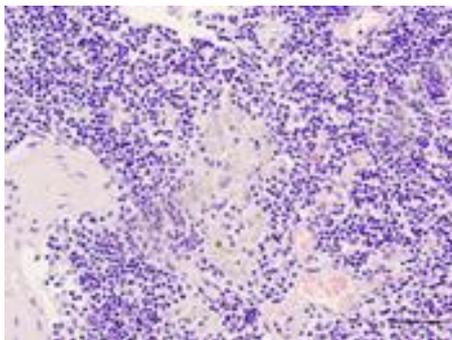
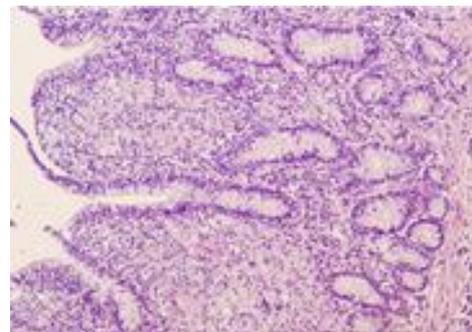


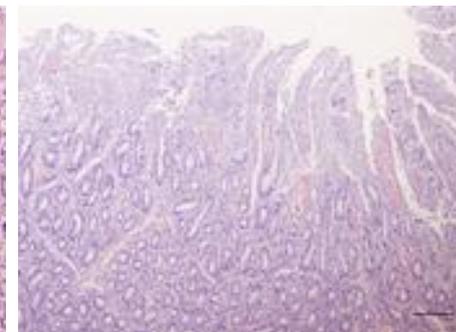
Imagen: <http://pequenoldn.librodenotas.com>



Lesión histológica focal



Lesiones granulomatosas multifocales y difusas



## PROBLEMA



↓ sensibilidad detección infecciones latentes / fases subclínicas



Test que diferencie infección latente vs. patente

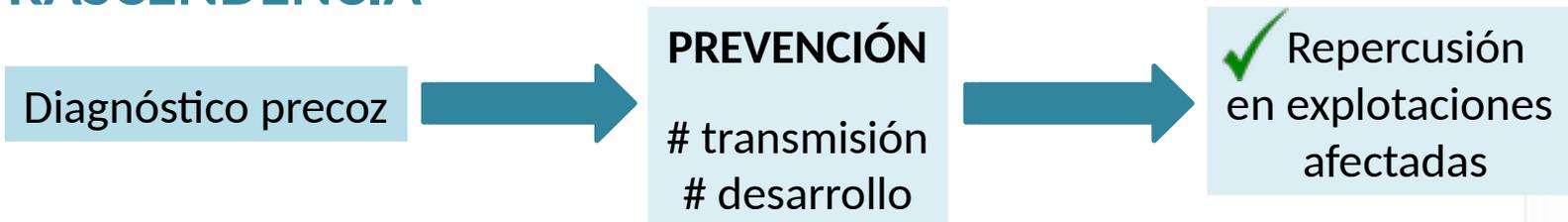
## SOLUCIÓN



Desarrollo **nuevos métodos diagnósticos para la detección precoz** de la PTB bovina

**Nuevo abordaje:** detección en suero de biomarcadores proteicos específicos de las distintas formas histopatológicas en las que se manifiesta la enfermedad

## TRASCENDENCIA



# SOLUCIÓN (ESTRATEGIA)



Desarrollo **nuevos métodos diagnóstico para la detección precoz** de la PTB bovina

**Nuevo abordaje:** detección en suero de biomarcadores proteicos específicos de las distintas formas histopatológicas en las que se manifiesta la enfermedad



Imagen: Rosa Casais

💡 Especial interés: diagnóstico precoz

💡 Diagnóstico específico animales con otras lesiones

## PROCEDENCIA DE LAS MUESTRAS



Imagen: ganadería Fernando Soto. Cristina Blanco



Imagen: <http://www.elcomercio.es>

### Ganadería 1

Perlora (Asturias)  
100 vacas raza frisona  
7 - 8 % prevalencia PTB

### Ganadería 2

Gozón (Asturias)  
61 vacas raza frisona  
Libre de PTB

### Matadero

Noreña (Asturias)  
36 vacas raza frisona

## TIPO DE MUESTRAS

- SANGRE
- TEJIDO INTESTINAL (**Válvula ileocecal**, ganglio ileocecal, yeyuno caudal y ganglio yeyunal caudal)
- HECES

# CLASIFICACIÓN ANIMALES

## HISTOLÓGICAMENTE (González et al., 2005) (n=81)

Intensidad

Localización

Cantidad BAAR

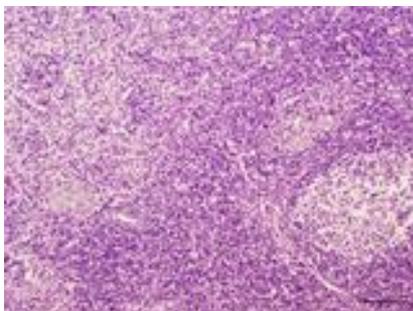
Tipo células inflamatorias

FOCAL (n=50)

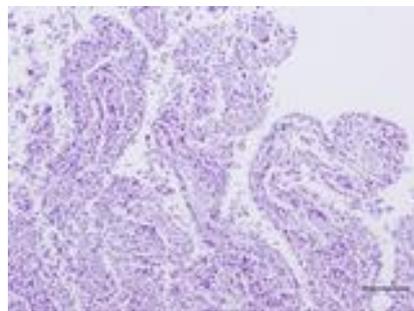
MULTIFOCAL (n=12)

DIFUSA (n=10)

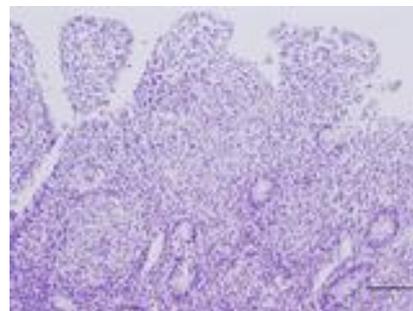
SIN LESIONES (n=6)



Ganglio yeyunal caudal.  
H-E. Barra = 100µm



Yeyuno caudal.  
H-E. Barra = 100µm



Yeyuno caudal.  
H-E. Barra = 100µm

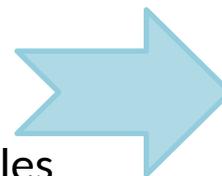


Válvula ileocecal.  
H-E. Barra = 200µm

## SEROLOGÍA (n=139)

Sueros de:

- 61 animales control (sin lesiones)
- 78 animales sacrificados
  - 50 lesiones focales
  - 12 lesiones multifocales
  - 10 lesiones difusas
- 6 sin lesiones



139 sueros

Imagen: <https://instrumentosdelaboratorio.org>

# IDENTIFICACIÓN BIOMARCADORES

¿Cómo  
identificamos los  
biomarcadores?



**Análisis transcriptómico** mediante RNAseq de muestras de sangre completa de animales sacrificados .

Biomarcadores expresados diferencialmente entre distintos grupos lesionales y el control.

## BIOMARCADORES SELECCIONADOS

LESIONES FOCALES		LESIONES DIFUSAS	
Biomarcador	log2_fold_change	Biomarcador	Log2_fold_change
Bio 14	3.74	Bio 8	3.75
Bio 15	1.89	Bio 6	2.15



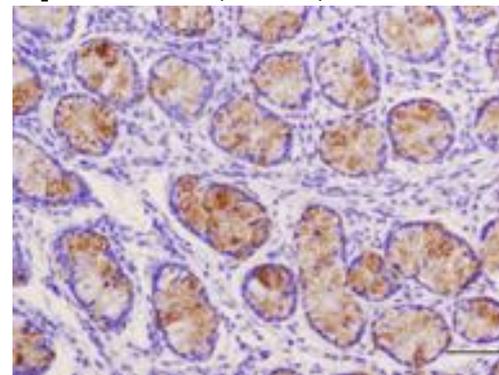
Validación mediante **ELISAs específicos comerciales** y evaluación por análisis ROC (Receiver Operating Characteristic Curve).

Posibilidad validación por **Inmunohistoquímica (IHQ)**.

Más compleja

Más tiempo

En curso...



Válvula ileocecal. IHQ Biomarcador 1. Barra= 50µm

	Prueba	Pto corte	Sen (%)	Sp (%)	VD
Focales vs Control	ELISA BIO 6	4.31	2.00	96.72	0.500
	ELISA BIO 8	31	62.00	80.33	0.710
	<b>ELISA BIO 14</b>	<b>1.5</b>	<b>88.00</b>	<b>91.80</b>	<b>0.899</b>
	ELISA BIO 15	37	88.00	72.13	0.800
	<b>ELISA IDEXX</b>	/	<b>6.00</b>	<b>100</b>	<b>0.530</b>
	PCR HECES	/	4.00	100	0.520
	PCR TEJIDOS	/	24.00		0.620
	CULTIVO HECES	/	6.00	100	0.530
	CULTIVO TEJIDOS	/	30.00		0.650
Lesiones vs Control	ELISA BIO 6	1.01	60.00	72.13	0.660
	ELISA BIO 8	51	25.00	96.72	0.609
	<b>ELISA BIO 14</b>	<b>1.5</b>	<b>80.56</b>	<b>90.16</b>	<b>0.854</b>
	ELISA BIO 15	30	93.06	69.00	0.809
	<b>ELISA IDEXX</b>	/	<b>22.54</b>	<b>100</b>	<b>0.610</b>
	PCR HECES	/	21.13	100	0.610
	PCR TEJIDOS	/	35.21		0.680
	CULTIVO HECES	/	12.68	100	0.560
	CULTIVO TEJIDOS	/	42.25		0.710

Se = sensibilidad

Sp = especificidad

VD= Valor diagnóstico = semisuma Se + Sp

**Valores obtenidos de los biomarcadores superan** los de cualquier prueba actualmente disponible



Imagen: <http://www.pinterest.jp>

Su uso en los programas de control de la PTB permitiría una **detección rápida y eficiente** de la infección subclínica, **impidiendo la transmisión** del agente a otros animales de la explotación.

# AGRADECIMIENTOS

Este estudio forma parte del proyecto coordinado “Marcadores Inmunológicos y genéticos asociados a infecciones latentes o patentes causadas por *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*” que ha sido financiado por el Instituto Nacional de Investigaciones Agrarias (INIA RTA-2014-00009-C02), el Ministerio de Ciencia, Innovación y Universidades (MICINN RTI2018-094192-R-C22), Fondos Europeos para el Desarrollo Regional (FEDER) y fondos regionales PCTI 2018-2020 (GRUPIN: ID2018-000237).

## Área de Sanidad Animal SERIDA



## Dpto. Sanidad Animal NEIKER



## Laboratorio Sanidad Animal Principado de Asturias



universidad  
del León

## Otros colaboradores

- Ganadería de Fernando Soto (Perlora, Asturias)
- Ganadería de Flor (Gozón, Asturias)
- Matadero de Noreña (Asturias)
- Matadero de Avilés (Asturias)
- Matadero de Gijón (Asturias)
- Servicios Veterinarios ASTEGA (Candás, Asturias)
- Unidad de Genómica del Parque Científico de Madrid
- Asesoría estadística servicios científico-técnicos de la Universidad de Oviedo.





**¡ GRACIAS POR VUESTRA ATENCIÓN !**