

Convegno "Paratubercolosi:
La diagnosi, il territorio, la politica: ricomporre il puzzle"

Diagnosi della Paratubercolosi: interpretazione critica del dato diagnostico



Norma Arrigoni

Centro Referenza Nazionale per la Paratubercolosi
Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia-Romagna, Piacenza



Viterbo, 12 dicembre 2011

1

Sommario

- Centro Referenza Paratubercolosi
 - compiti
 - attività
- Introduzione: dobbiamo preoccuparci?
- I test diagnostici
 - diretti
 - Indiretti
- Interpretazione e utilizzo dei risultati



Viterbo, 12 dicembre 2011

2



CRN per la Paratubercolosi

Attivato dal Ministero della Salute nel 2003

Compiti principali:

- Conferma diagnostica
- Standardizzazione dei metodi analitici
- Organizzazione proficiency tests
- Predisposizione piani intervento
- Formazione
- Ricerca



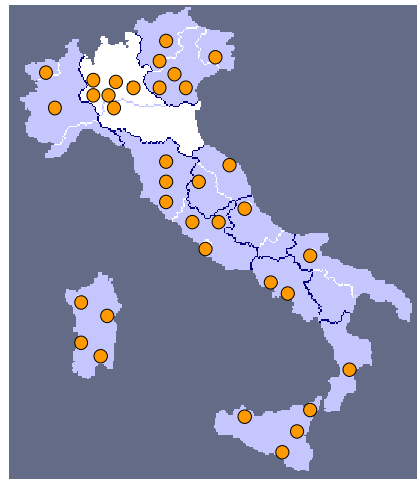
Proficiency test sierologia

2005: 28 laboratori

2006: 33 laboratori

2008: 30 laboratori

2010: 34 laboratori



Proficiency test coltura

2006: 11 laboratori/9 IZS
2009: 10 laboratori/8 IZS
2011: 13 laboratori/10 IZS

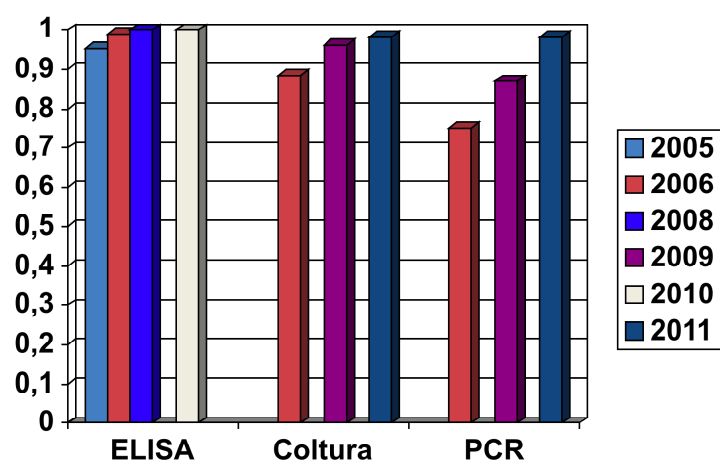


Proficiency test PCR

2006: 8 laboratori/ 7 IZS
2009: 13 laboratori/8 IZS
2011: 15 laboratori/9 IZS



Accuratezza

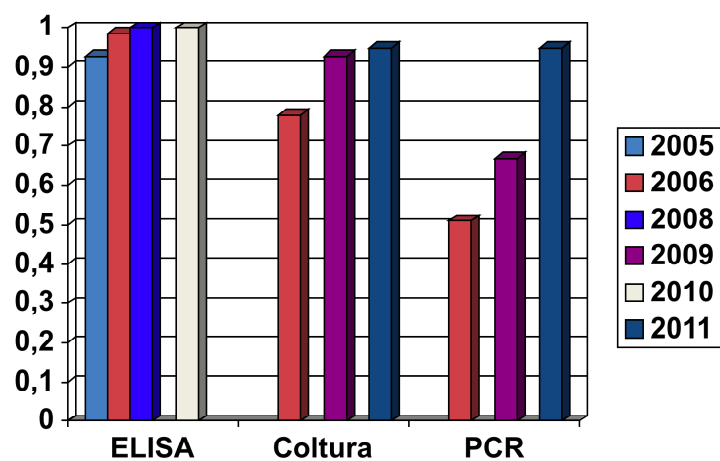


Viterbo, 12 dicembre 2011

7



Indice di Youden



Viterbo, 12 dicembre 2011

8



Formazione



Docenza a oltre 60 congressi in tutta Italia



Formazione

- Organizzazione di Convegni Nazionali annuali
- Aggiornamenti sul tema Paratubercolosi
- Discussione dei risultati dei ring test
- Stimolo alla condivisione e al miglioramento



**The National Reference Centre for Paratuberculosis
is pleased to invite you to Parma (Italy) for the**

12th

**INTERNATIONAL COLLOQUIUM
ON PARATUBERCULOSIS**

Giugno 2014



Istituto Zooprofilattico Sperimentale
della Lombardia e dell'Emilia Romagna "Bruno Ubertini"



Ricerca

- *Indagine sulla prevalenza di paratubercolosi negli allevamenti bovini da latte della Lombardia e dell' Emilia Romagna*
- *Messa a punto, confronto e validazione di test diagnostici*
- *Indagine sulla contaminazione del latte di massa da parte di Map*
- *Messa a punto di protocolli diagnostici per la ricerca di Map da matrici lattiero-casearie*
- *Studio sulla persistenza di Map nei foraggi concimati con effluenti di allevamenti infetti*
- *Messa a punto di antigeni da impiegare per la rilevazione dell'immunità cellulo-mediata*
- *Epidemiologia molecolare su ceppi di Map isolati in Italia*



Predisposizione di piani di intervento

- Manuale per il controllo della paratubercolosi negli allevamenti di bovine da latte
- Manuale per il controllo della paratubercolosi negli allevamenti di bovine da latte
- Piano di certificazione
- Brochure informativa per gli allevatori

Disponibili sul sito del Centro di riferimento: www.izsler.it



Perchè preoccuparsi?



Impatto economico



- Impatto sulla salute e sul benessere animale (forme cliniche)
- Ridotta produzione lattea
- Perdita di peso e ridotto valore della carcassa al macello
- Riforma anticipata
- Perdita di potenziale genetico
- Associazione con mastite, polmonite, infertilità
- Restrizioni nel commercio degli animali e dei prodotti
- Implementazione di piani di controllo

Perdite stimate negli allevamenti da latte (Dufour, 2004):

- per vacca con sintomi clinici 1940 €
- per vacca con infezione subclinica 461 €



A review of prevalences of paratuberculosis in Europe

Nielsen, 2008, Prev. Vet. Med



Migliore stima prevalenza reale:
50% allevamenti
20% animali



La situazione italiana

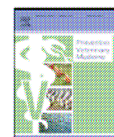
Preventive Veterinary Medicine 102 (2011) 83–86



Contents lists available at ScienceDirect

Preventive Veterinary Medicine

journal homepage: www.elsevier.com/locate/prevetmed



Short communication

Prevalence of paratuberculosis infection in dairy cattle in Northern Italy

N. Pozzato^{a,*,1}, K. Capello^{b,1}, A. Comin^b, N. Toft^c, S.S. Nielsen^c, G. Vicenzoni^a, N. Arrigoni^d

^a Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie, Sezione di Verona, Via San Giacomo 5, 37135 Verona, Italy

^b Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie, Viale dell'Università 10, 35020 Legnaro, Italy

^c Department of Large Animal Sciences, Faculty of Life Sciences, University of Copenhagen, Grønnegårdsvej 8, DK-1870 Frederiksberg C, Denmark

^d Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia ed Emilia Romagna, Sezione di Piacenza, Strada della Faggiola 1, 29027 Gariga di Podenzano, Italy

Viterbo, 12 dicembre 2011

17



Assenza di terapie efficaci



- Alcune molecole sono efficaci *in vitro*
- Nessuna è completamente efficace *in vivo*
 - Guarigione clinica
 - Persistenza dell'eliminazione di Map
 - Ricaduta dopo sospensione

Viterbo, 12 dicembre 2011

18



Vaccinazione



VANTAGGI

- Forme cliniche meno frequenti e più tardive
- Ridotte perdite economiche (vita produttiva più prolungata)
- Ridotta gravità delle lesioni anatomopatologiche ed istologiche
- Ridotta escrezione fecale

SVANTAGGI

- Non completamente protettiva
- Interferenza con diagnosi indiretta di TBC e PTBC
- Reazioni locali (granuloma)



Possibile rapporto tra CD e Paratubercolosi

CEE Report Comitato Scientifico sulla Salute e sul Benessere Animale (2000):

...“Sono necessari ulteriori studi per chiarire questo importante quesito”.....

...”Indipendentemente dal possibile ruolo di Map nel Morbo di Crohn, l'applicazione di ogni mezzo volto ad eradicare la Paratubercolosi dall'allevamento animale deve costituire una priorità”...



Possibile rapporto tra CD e Paratubercolosi

Report UK Food Standard Agency (2002):

...“Abbiamo un potenziale patogeno per l'uomo nei ruminanti e in altri animali d'allevamento. L'esposizione della popolazione umana è in probabile aumento. In attesa di ulteriori chiarimenti riguardo la patogenicità per l'uomo, è comunque necessario, in via precauzionale, applicare tutte le misure necessarie a ridurre l'esposizione dell'uomo”...



Malattia di Crohn e Map

Meta-analisi su 18 studi caso-controllo di pazienti CD vs. controlli, mediante PCR nei tessuti o nel sangue

OR osservati: 0,04-31,5
OR medio: 7,01 (3,95-12,94)

Feller et Al.(2007): *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* and Crohn's disease: a systematic review and meta-analysis. <http://infection.thelancet.com> 2007, 7

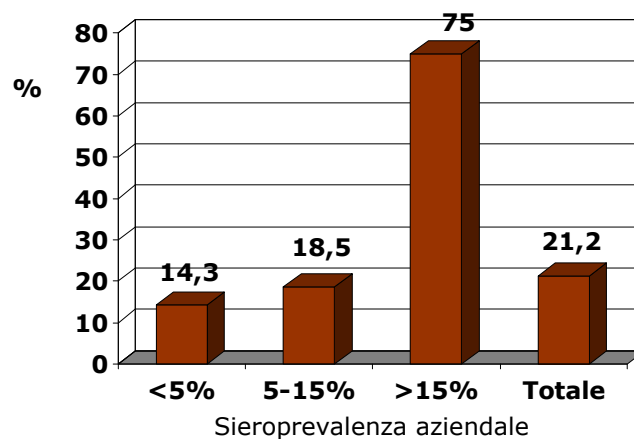


Contaminazione della catena alimentare

- Latte e derivati
- Carni
- Acqua



% aziende infette produttrici
di latte contaminato da Map



Arrigoni et al. 2007, Proc. 9 ICP, Tsukuba

Sorveglianza su prodotti in commercio: latte pastorizzato e derivati



Riferimento	Paese	Campioni analizzati	PCR % pos	Coltura % pos
Gao, 2002	Canada	710 campioni, latte pastorizzato	15%	0%
Grant, 2002	UK	567 campioni, latte pastorizzato	11.8%	1.8%
O'Reilly, 2004	Ireland	357 campioni, latte pastorizzato	10%	0%
Ayele, 2005	Czech Republic	244 campioni, latte pastorizzato 100 campioni, latte pastorizzato	NA NA	1.6% 2.0%
Elligson, 2005	USA	702 campioni, latte pastorizzato	NA	2.8%
Ikonomopoulos, 2005	Greece and Check Republic	Formaggi (feta, formaggi molli, semi-duri e duri)	31.7%	3.6%
Clark, 2006	USA	98 campioni, formaggi	5%	0%
Stephan, 2007	Switzerland	143 campioni, formaggi al latte crudo	4.2%	0%

Eltholth et al. J.Appl.Microb. 107 (2009) 1061-1071



NEWS: Ulteriore motivo di preoccupazione!!

Garanzie sanitarie richieste per l'esportazione:

- **India:**
I prodotti lattiero-caseari devono aver subito un trattamento tecnologico di provata efficacia verso Map
- **Cina:**
Gli allevamenti produttori di latte non devono presentare casi di paratubercolosi clinica



Export di prodotti lattiero caseari italiani

Dati Assolatte - anno 2010

Nel mondo Kg 272.356.307 (€ 1.659.876.287)
In Europa Kg 221.812.318 (81%) (€ 1.292.802.736)

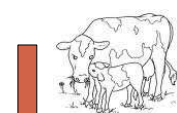
% PRODOTTI ESPORTATI

37.3% Formaggi freschi
25.2% Grana Padano e Parmigiano Reggiano
5.5% Fiore sardo e Pecorino
5.0% Gorgonzola
1.7% Provolone
0.7% Italico e Taleggio
0.6% Asiago, Caciocavallo, Montasio, Ragusano
0.3% Fontal e Fontina



Patogenesi

Esposizione



Età
Dose infettante
Frequenza esposizione
Suscettibilità genetica

Resistenza



Predisposizione genetica

Infezione



Parto
Alimentazione scadente
Elevata produzione latte
Infestazioni parassitaria
Pascolo su terre carenti in minerali

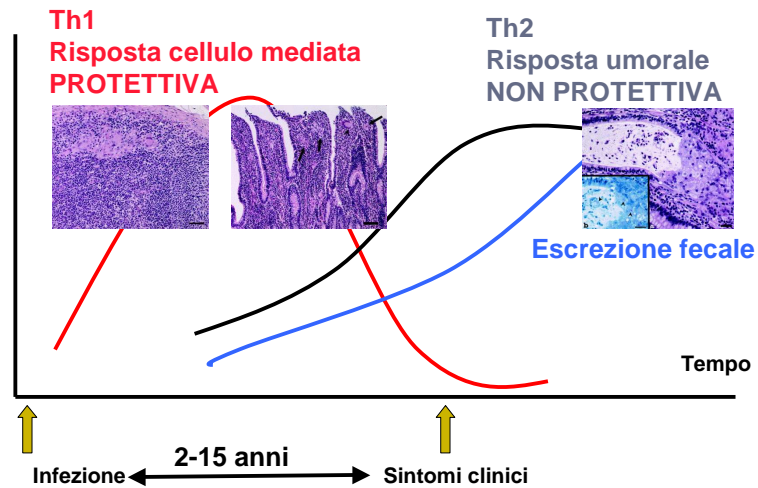


Sintomi clinici

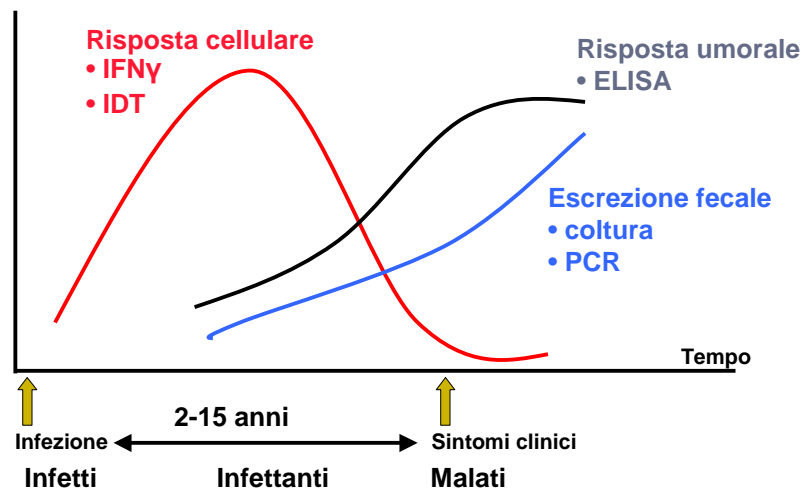


Patogenesi

Gonzales et al. J.Comp.Path. 2005, 133, 184-196



Diagnosi di Paratubercolosi



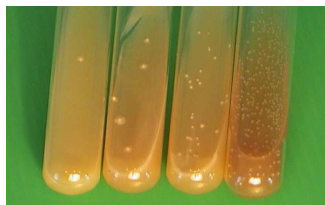
Coltura fecale: è il test migliore?

PRO:

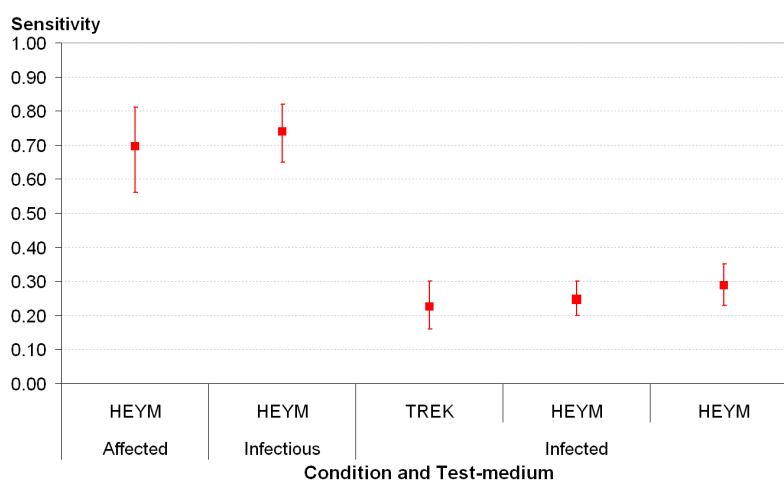
- Impatto diretto sul controllo
- Specificità analitica 100%
- Ceppi disponibili per genotyping

CONTRO:

- Sensibilità limitata (<35%)
- Costi elevati
- Tempi lunghi di risposta (fino a 16 settimane)
- Ceppi non coltivabili
- Fenomeno del "Passive shedding"



Sensibilità della coltura fecale



Nielsen and Toft, 2008 Vet. Microb., 129, 217-235



PCR: punti critici

- Costi elevati
- Sensibilità limitata
 - Basso numero di microrganismi
 - Matrici complesse (feci, latte)
 - Inibitori
 - Spessa parete cellulare
- Specificità non assoluta (sequenze IS900-like)
- Non distingue le cellule vive da quelle morte



ELISA

PRO

- Costi molto ridotti
- Specificità elevata (>99%)
- Eseguita da sangue e latte
- Rapido ed automatizzabile

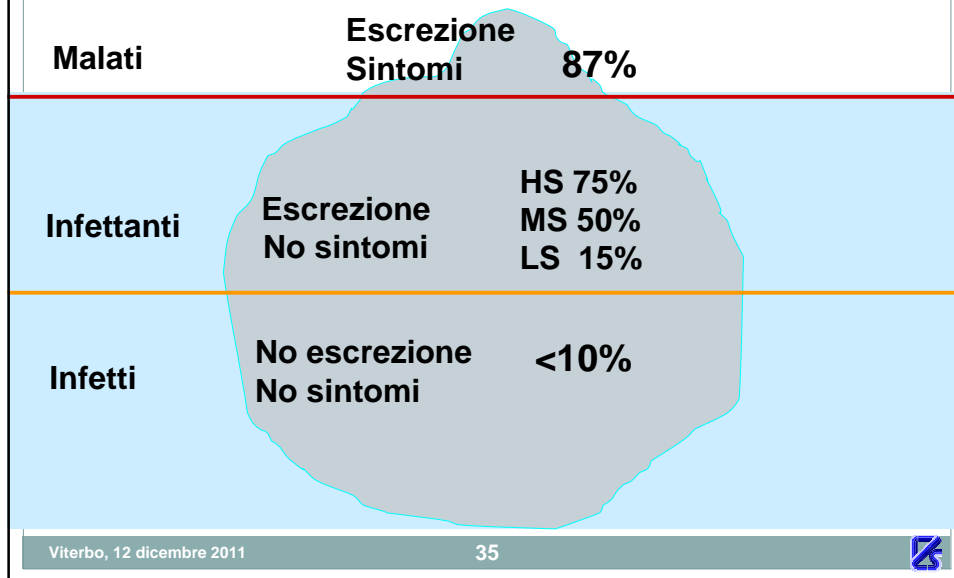
CONTRO

- Sensibilità limitata (<30%)



Test ELISA: sensibilità

Whitlock, Vet.Microb. 77 (2000) 387-398



Conclusioni: utilizzo dei test diagnostici

- Paratubercolosi: infezione cronica con molti stadi
- In generale: i test diagnostici sono poco sensibili
- Per aumentare la sensibilità:
 - ripetere il test
 - associare più test

Conclusioni: utilizzo dei test diagnostici

- Perchè facciamo il test? Definire gli obiettivi:
 - Identificare gli allevamenti infetti
 - Identificare gli animali positivi (piani di controllo)
 - Certificare gli allevamenti negativi
- Quali decisioni verranno adottate sulla base dei risultati?
- Quali test forniscono i migliori risultati in termini di costo-beneficio?
- Come effettuare il campionamento?
- Come verranno utilizzati i risultati nella pratica?



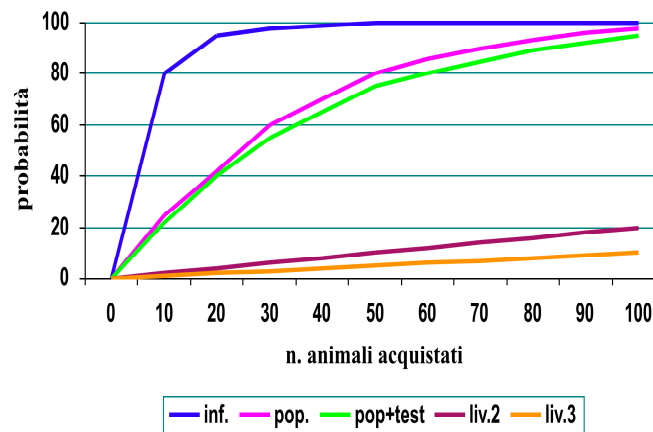
Scelta del test: fattori da considerare

- Performances documentate (Se e Sp) per ogni specifica fase
- Logistica/fattibilità – campionamento e test
- Costi – campionamento e test



Modello della probabilità binomiale che almeno un animale introdotto sia infetto da *Map*

Smith D.R., 2002



Save the dates!!

11 ICP: 2012 february (Sidney, Aus)

12 ICP: 2014 june (Parma, I)



IAP (International Organization for Paratuberculosis)

<http://www.paratuberculosis.org>

10 ICP (International Colloquium on Paratuberculosis)

<http://www.cvm.umn.edu/outreach/events/icp/presentations/home.html>

CRN Paratuberculosis, IZSLER

http://www.izsler.it/izs_bs/s2magazine/index1.jsp?idPagina=441

