

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



# Sommario

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



# 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

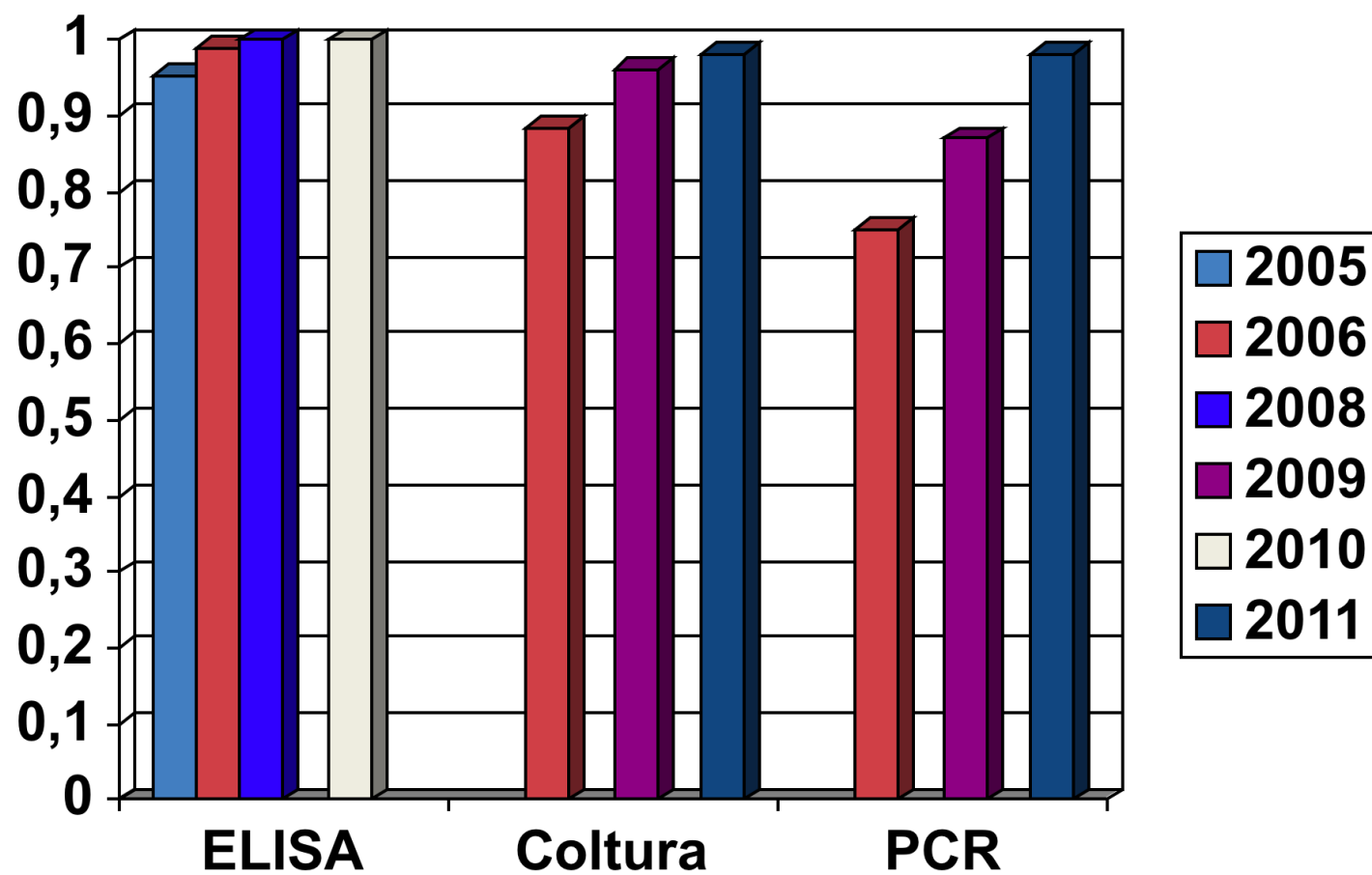
2006: 8 laboratori/ 7 IZS

2009: 13 laboratori/8 IZS

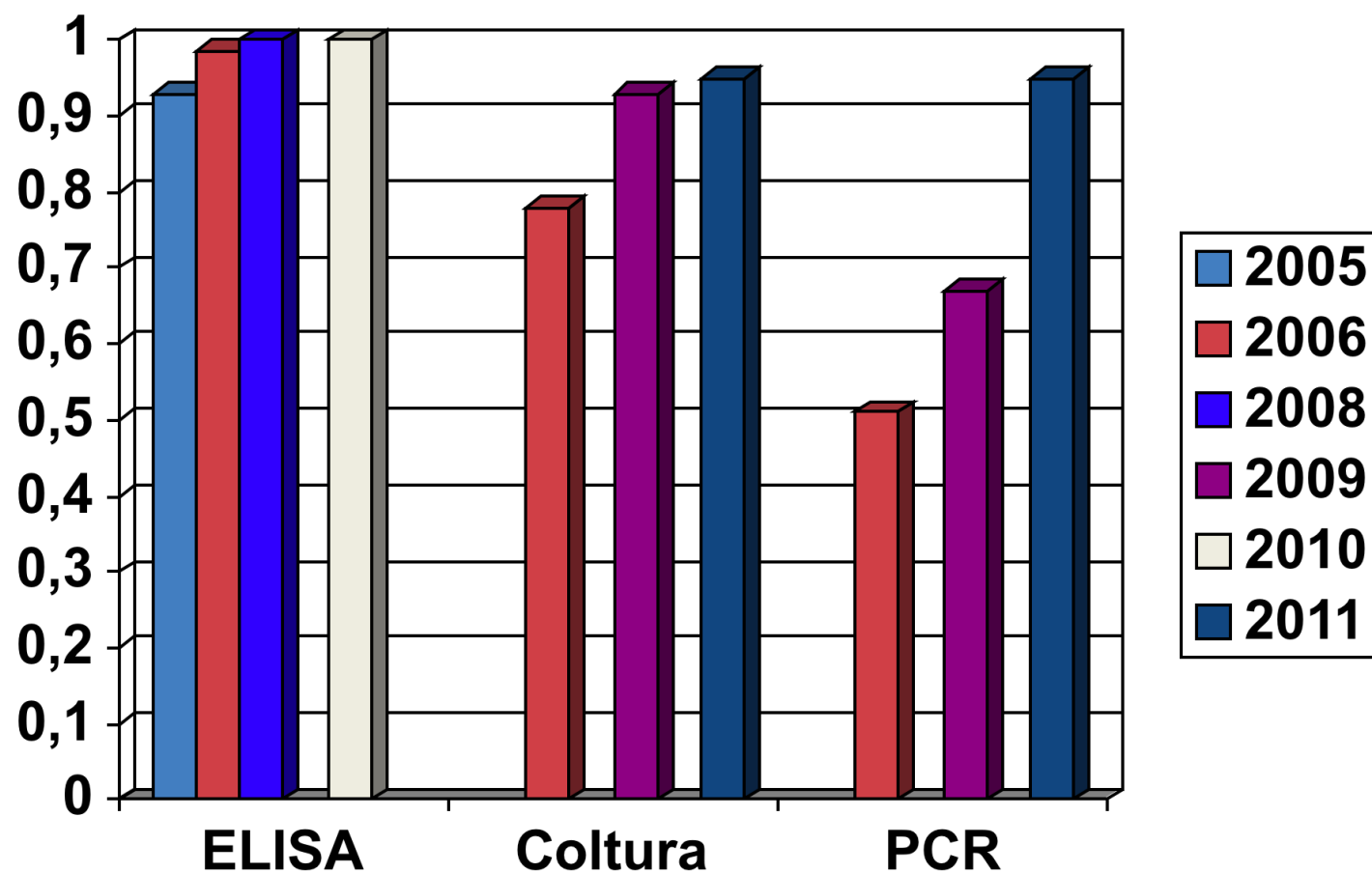
2011: 15 laboratori/9 IZS



# Accuratezza



# Indice di Youden





# 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**

**12<sup>th</sup>**

**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](http://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](http://www.elsevier.com/locate/prevetmed)



Short communication

### Prevalence of paratuberculosis infection in dairy cattle in Northern Italy

N. Pozzato<sup>a,\*,1</sup>, K. Capello<sup>b,1</sup>, A. Comin<sup>b</sup>, N. Toft<sup>c</sup>, S.S. Nielsen<sup>c</sup>, G. Vicenzoni<sup>a</sup>, N. Arrigoni<sup>d</sup>

<sup>a</sup> Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie, Sezione di Verona, Via San Giacomo 5, 37135 Verona, Italy

<sup>b</sup> Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie, Viale dell'Università 10, 35020 Legnaro, Italy

<sup>c</sup> Department of Large Animal Sciences, Faculty of Life Sciences, University of Copenhagen, Grønnegårdsvej 8, DK-1870 Frederiksberg C, Denmark

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

# 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

# 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

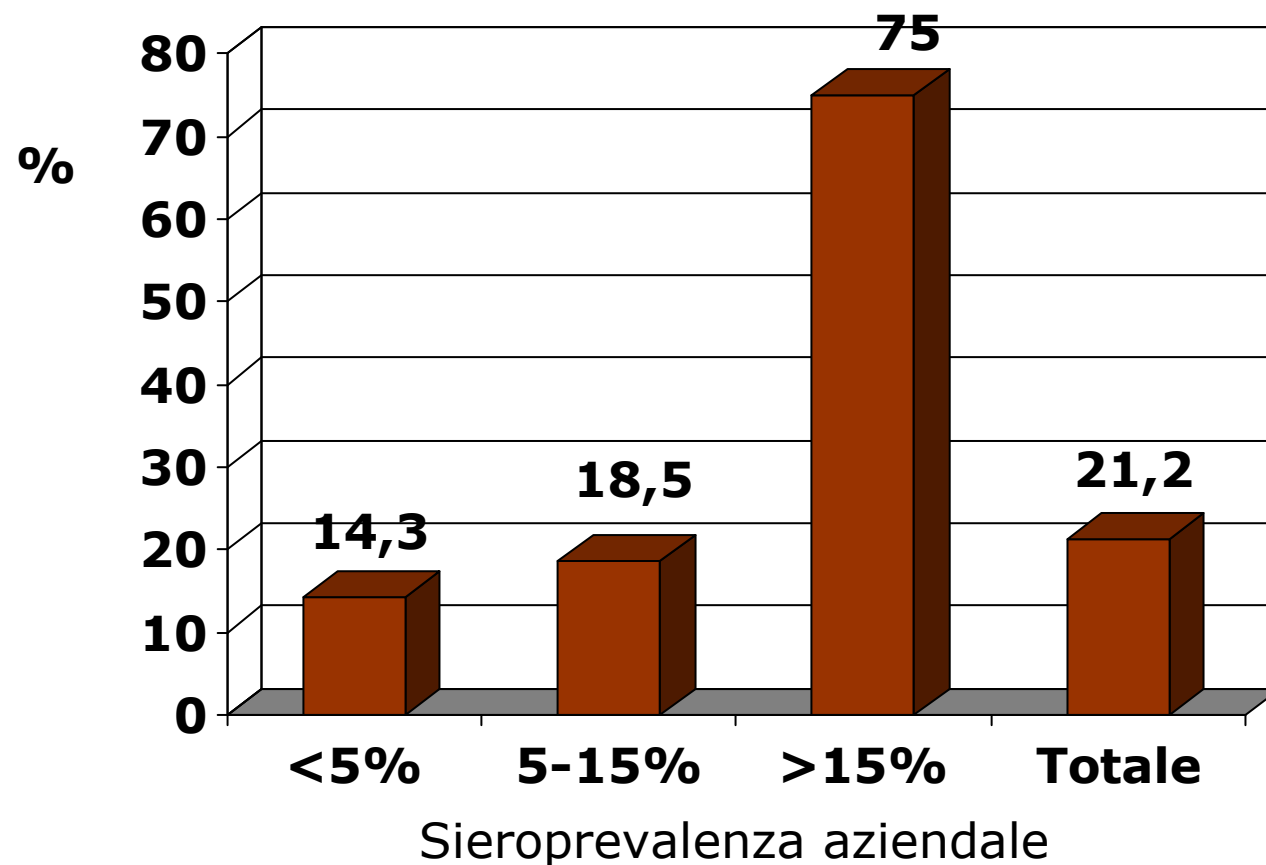


# Contaminazione della catena alimentare

- 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	NA	1.6%
		100 campioni, latte pastorizzato	NA	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

<b>Nel mondo</b>	Kg 272.356.307	(€ 1.659.876.287)
<b>In Europa</b>	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

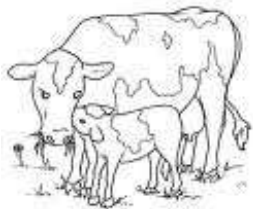
0.6% Asiago, Caciocavallo, Montasio, Ragusano

0.3% Fontal e Fontina



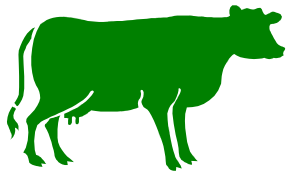
# Patogenesi

## Esposizione



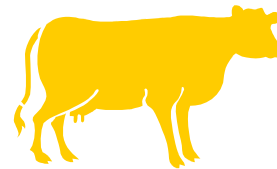
Età  
Dose infettante  
Frequenza esposizione  
Suscettibilità genetica

## Resistenza

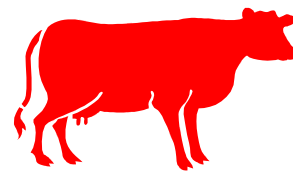


## Predisposizione genetica

## Infezione



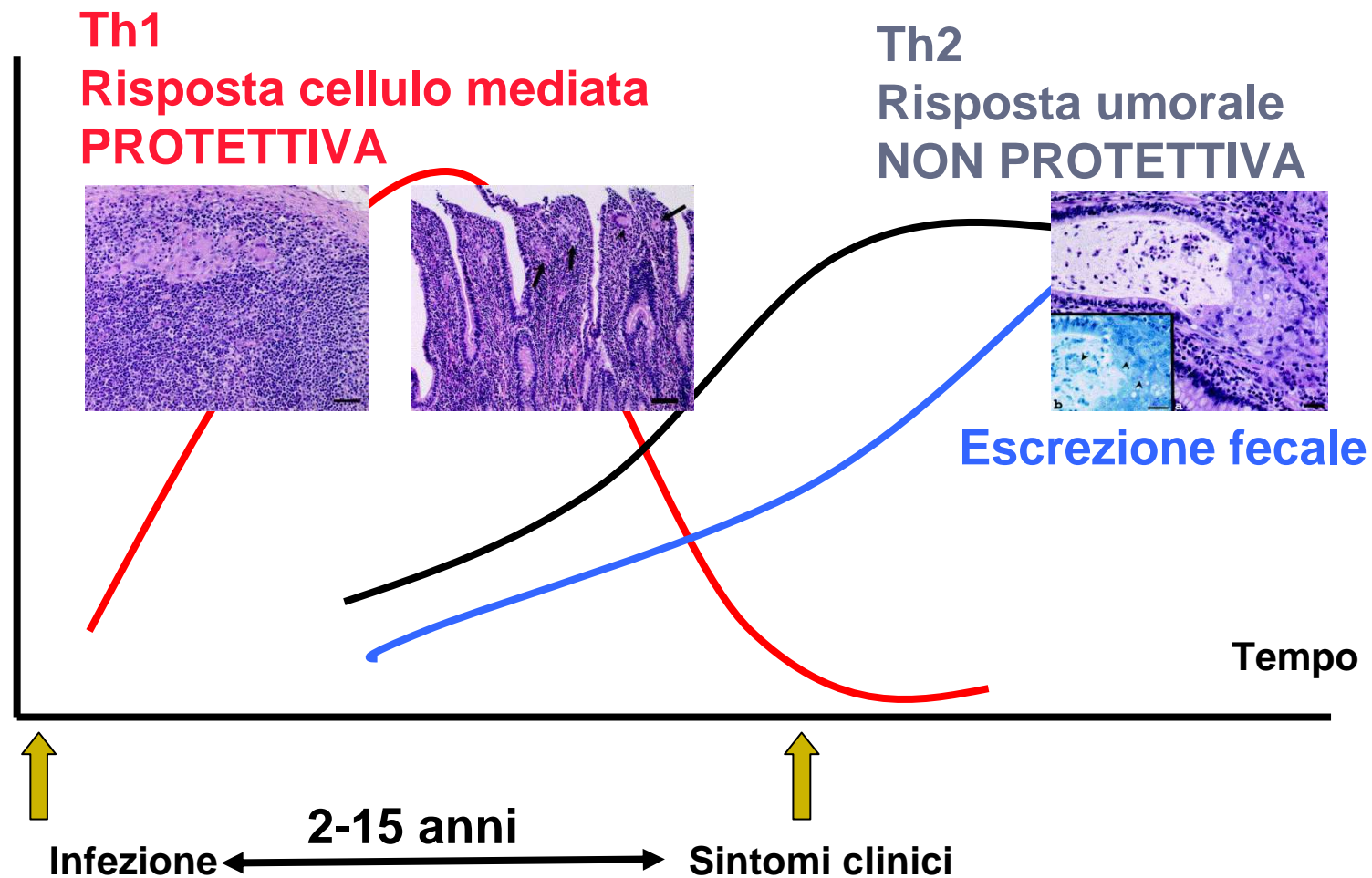
Parto  
Alimentazione scadente  
Elevata produzione latte  
Infestazioni parassitaria  
Pascolo su terre carenti in minerali



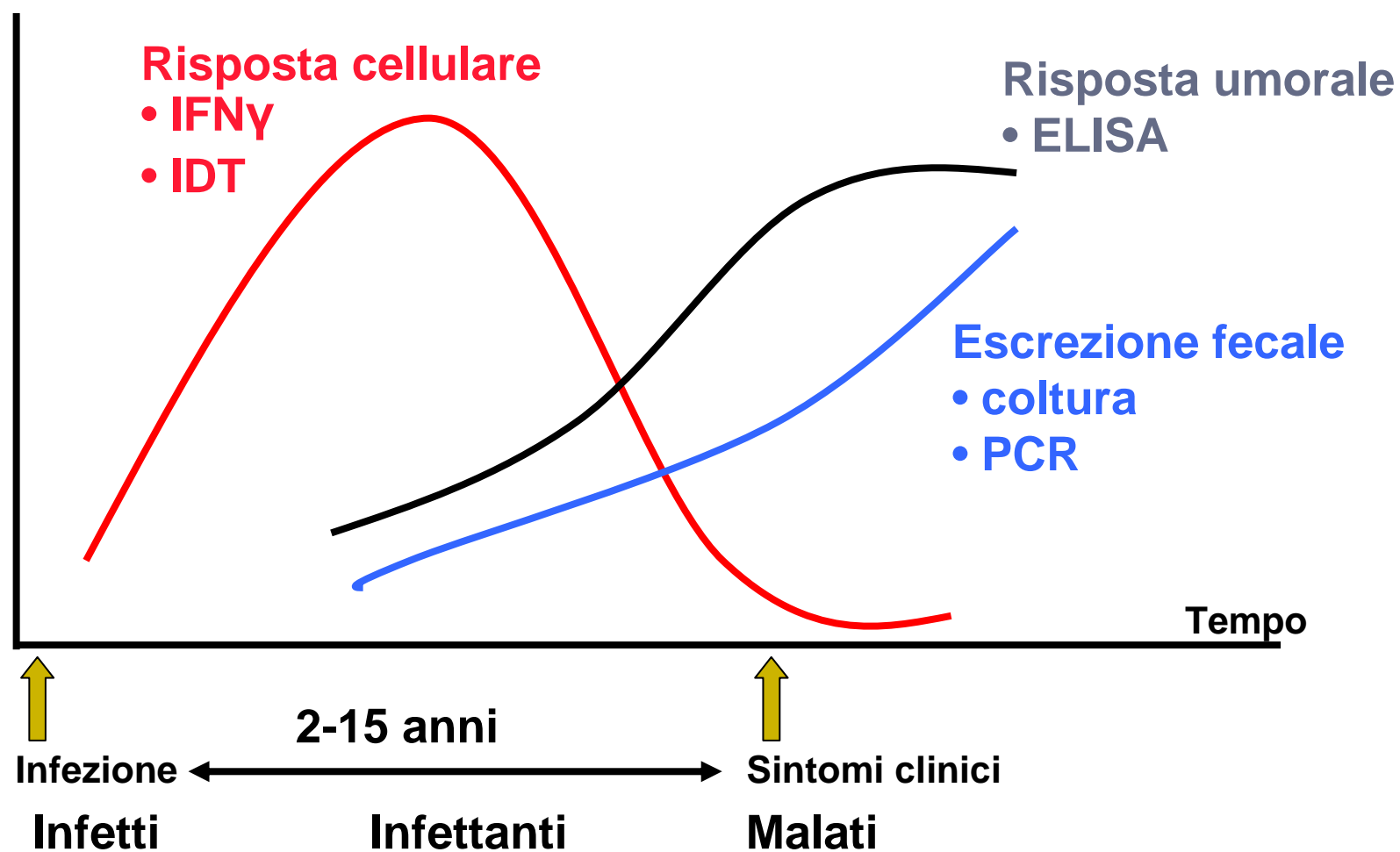
## Sintomi clinici

# Patogenesi

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



# Diagnosi di Paratubercolosi



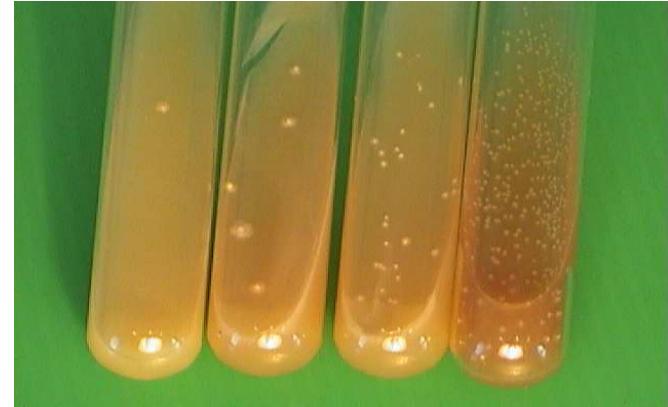
# Coltura fecale: è il test migliore?

## PRO:

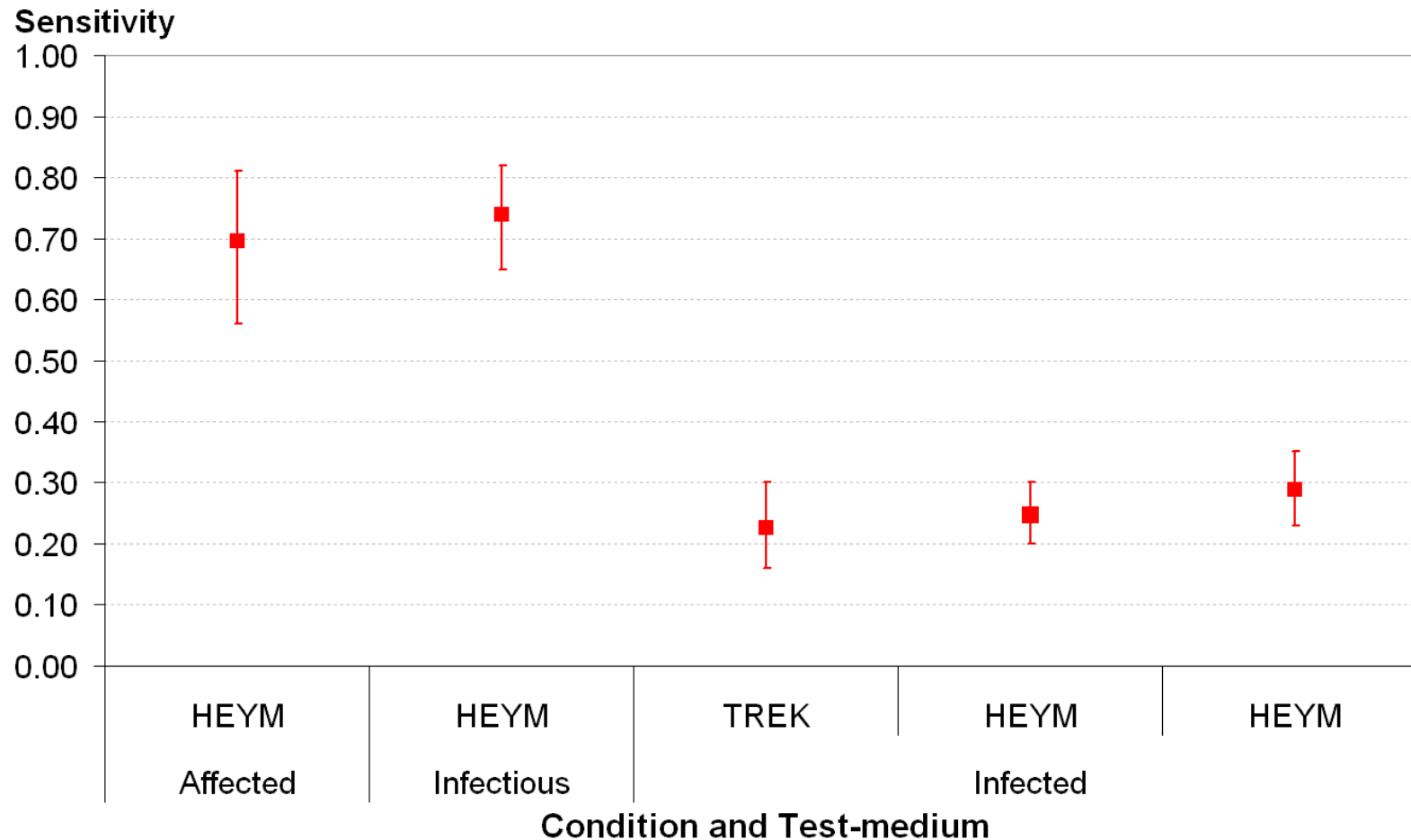
- Impatto diretto sul controllo
- Specificità analitica 100%
- Ceppi disponibili per genotyping

## 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%)
- Eseguitibile da sangue e latte
- Rapido ed automatizzabile

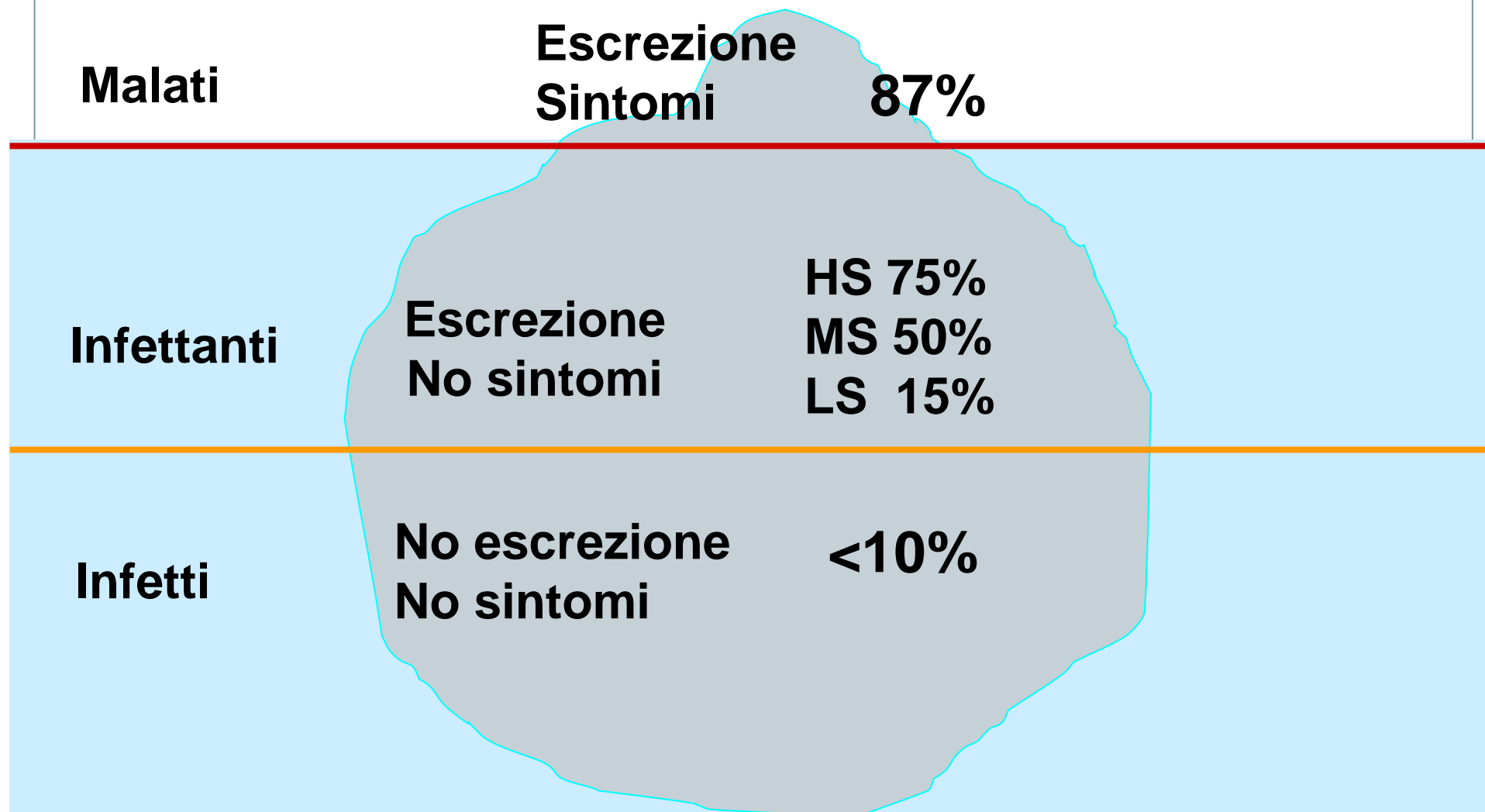
## CONTRO

- 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?



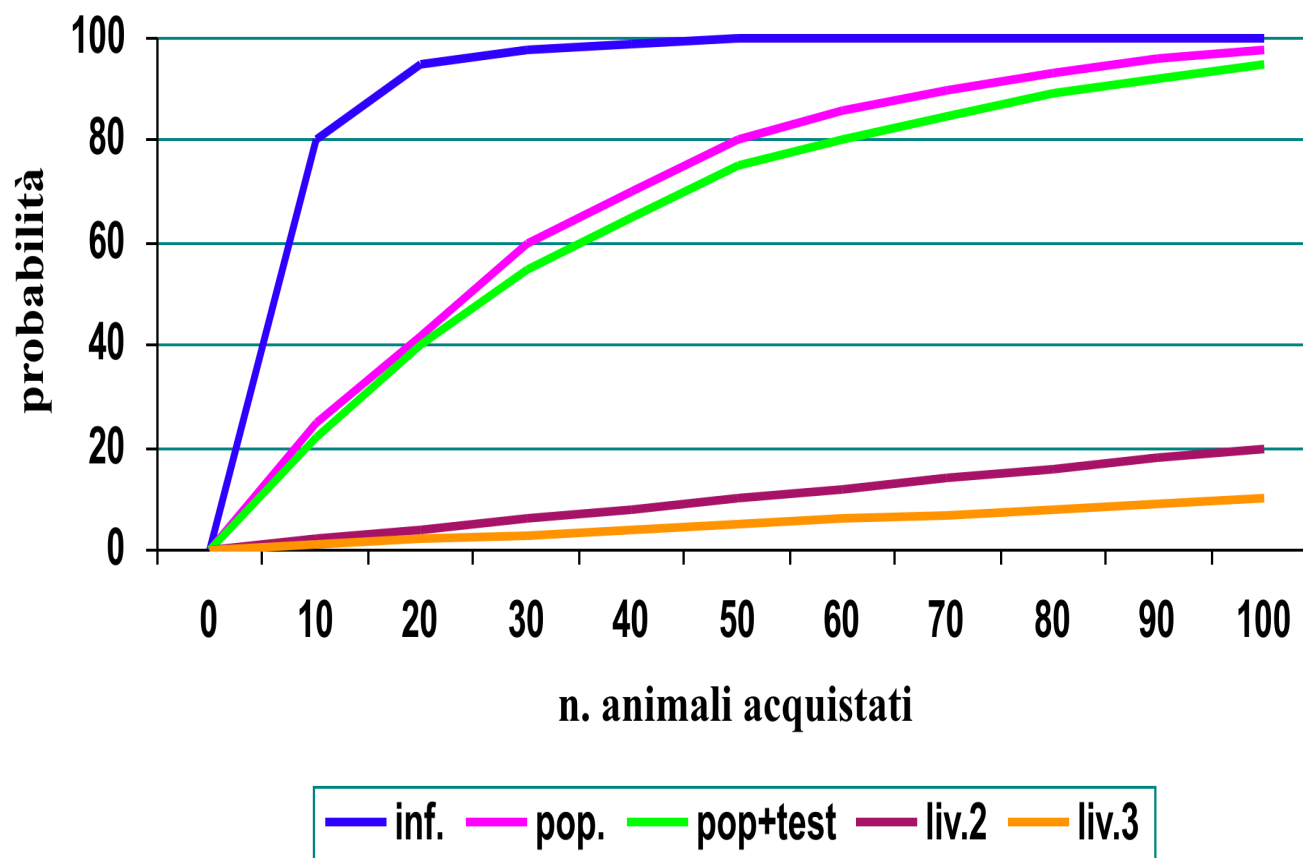
# Scelta del test: fattori da considerare

- 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 Paratubercolosi, IZSLER

[http://www.izsler.it/izs\\_bs/s2magazine/index1.jsp?idPagina=441](http://www.izsler.it/izs_bs/s2magazine/index1.jsp?idPagina=441)