



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PISA

FACOLTÀ DI MEDICINA VETERINARIA

SCUOLA DI SPECIALIZZAZIONE IN "SANITÀ ANIMALE  
ALLEVAMENTO E PRODUZIONI ZOOTECNICHE"

---

Tesi di Specializzazione in Medicina Veterinaria  
Anno Accademico 2011–2012

**Indagine epidemiologica sulla  
paratubercolosi bovina  
in Toscana**

*Candidato:*

DOTT.SSA CRISTINA STEFANI

*Relatore:*

PROF. D. CERRI

*Correlatore:*

DOTT.SSA M. BENEDETTI

*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.*

– Parere del Comitato Scientifico sulla Salute e sul Benessere Animale della  
Comunità Europea (2000).

*La malattia è destinata a diventare per le generazioni future un problema  
più grande della Tuberculosis per le generazioni presenti.*

– Moore (1924).

## RIASSUNTO

La paratubercolosi, sostenuta dal *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* (Map), è un'affezione a diffusione mondiale, propria dei ruminanti. È una malattia ad evoluzione cronica con progressivo dimagrimento e diarrea incoercibile nei bovini. La trasmissione avviene soprattutto per via orofecale. La paratubercolosi rappresenta un problema sanitario e zootecnico di rilevanti proporzioni a motivo della sua incidenza, della non disponibilità di valide strategie terapeutiche e preventive e degli ingenti danni economici da essa provocati.

Lo scopo di questo studio è quello di contribuire all'aggiornamento delle informazioni sulla prevalenza della paratubercolosi nelle aziende di bovine da latte del centro Italia.

È stata svolta un'attività di analisi di prevalenza mediante test ELISA su campioni di siero bovino. Successivamente è stata condotta un'indagine per valutare la presenza di Map nel latte di massa tramite prova PCR negli allevamenti positivi alle prove preliminari.

Il 52% degli allevamenti analizzati è risultato positivo e la prevalenza intra-aziendale è risultata pari al 6,23%. Il 9% del latte bovino è risultato positivo.

Parole chiave: Map, *Mycobacterium paratuberculosis*, paratubercolosi, Malattia di Johne.

## ABSTRACT

*Paratuberculosis is caused by Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis (Map) and it is found in ruminants worldwide. This chronic disease is characterized by cachexia and diarrhoea in cattle. It is most commonly transmitted by the fecal-oral route. Paratuberculosis represents an important risk for the public and animal health because of its incidence, the lack of preventive and therapeutical tools and economic losses. The purpose of this study is to update the information about prevalence of paratuberculosis on dairy cattle herds in central Italy.*

*It was carried out a prevalence analysis on bovine serum samples by an ELISA test. Afterwards bulk milk samples from infected herds was collected and analysed by PCR.*

*Herd-level prevalence was 52% and within-herd prevalence was 6,23% . The 9% of bulk milk samples was positive by PCR.*

*Key words: Map, Mycobacterium paratuberculosis, paratuberculosis, Johne's disease.*

Introduzione	vii
<b>I Parte generale</b>	<b>1</b>
<b>1 Cenni storici</b>	<b>2</b>
1.1 Storia della Paratubercolosi . . . . .	2
<b>2 Paratubercolosi</b>	<b>6</b>
2.1 Agente eziologico:	
<i>M. avium</i> subsp. <i>paratuberculosis</i> . . . . .	6
2.2 Epidemiologia . . . . .	13
2.3 Patogenesi . . . . .	16
2.4 Sintomatologia . . . . .	18
2.5 Lesioni anatomopatologiche . . . . .	21
2.6 Diagnosi . . . . .	23
2.6.1 Identificazione dell'agente infettivo . . . . .	23
2.6.2 Test sierologici . . . . .	25
2.7 Diffusione . . . . .	26
2.8 Impatto economico . . . . .	27
2.9 Vaccinazione . . . . .	29
2.10 Piani di controllo . . . . .	31
2.11 Presenza di Map nel latte e derivati . . . . .	34
2.12 Problemi di Sanità Pubblica . . . . .	35

---

<b>II</b>	<b>Parte sperimentale</b>	<b>37</b>
<b>3</b>	<b>Scopo della tesi</b>	<b>38</b>
<b>4</b>	<b>Materiali e metodi</b>	<b>39</b>
4.1	Raccolta e preparazione campioni . . . . .	39
4.2	Test ELISA . . . . .	40
4.2.1	Principi . . . . .	40
4.2.2	Componenti del kit ELISA . . . . .	41
4.2.3	Apparecchiature, materiali e reagenti impiegati . . . . .	41
4.2.4	Modalità Operativa . . . . .	42
4.2.5	Modalità di Calcolo . . . . .	43
4.2.6	Criteri di Valutazione . . . . .	44
4.3	Prova PCR . . . . .	45
<b>5</b>	<b>Risultati</b>	<b>49</b>
<b>6</b>	<b>Discussione e conclusioni</b>	<b>51</b>

## ELENCO DELLE FIGURE

1.1	H. A. Johne . . . . .	5
2.1	Map al microscopio . . . . .	12
2.2	“Effetto <i>Iceberg</i> ” . . . . .	19
2.3	Sintomatologia clinica . . . . .	21
2.4	Lesioni intestinali . . . . .	23
4.1	PCR . . . . .	47
4.2	Procedura di estrazione . . . . .	48

## ELENCO DELLE TABELLE

2.1	Classificazione dei Micobatteri . . . . .	7
2.2	Caratteri fenotipici delle principali specie micobatteriche . . . . .	8
2.3	Principali regioni conservate del genoma micobatterico . . . . .	9
2.4	Classificazione di Runyon . . . . .	9
2.5	Complex del genere <i>Mycobacterium</i> . . . . .	10
2.6	Principali micobatteri non tubercolari (MOTT) negli animali . . . . .	11
2.7	Paratubercolosi in Italia . . . . .	27
2.8	Dati paratubercolosi Lombardia e Veneto . . . . .	27
2.9	Prevalenza apparente di Map negli allevamenti europei . . . . .	28
2.10	Concentrazione di Map nel latte . . . . .	34
4.1	Distribuzione della popolazione secondo l'età . . . . .	40
4.2	Criteri di valutazione test Elisa . . . . .	45
4.3	Reagenti necessari per la prova PCR . . . . .	47
5.1	Distribuzione della popolazione positiva secondo l'età . . . . .	50
5.2	Risultati delle analisi ELISA . . . . .	50

## INTRODUZIONE

La paratubercolosi, nota come “malattia di Johne”, sostenuta dal *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (Map), è una patologia a diffusione mondiale, particolarmente presente in zone umide e temperate, propria dei ruminanti domestici e selvatici.

È caratterizzata clinicamente da evoluzione cronica, progressivo dimagrimento e diarrea incoercibile nei bovini. Anatomopatologicamente provoca un'enterite granulomatosa progressiva, contraddistinta da un ispessimento relativamente uniforme della mucosa. La trasmissione avviene soprattutto per via orofecale. Negli ovicaprini la paratubercolosi presenta con sintomi meno specifici che la rendono più difficilmente diagnosticabile dal punto di vista clinico.

La paratubercolosi rappresenta un problema sanitario e zootecnico di rilevanti proporzioni a motivo della sua incidenza, della non disponibilità di valide strategie terapeutiche e preventive, degli ingenti danni economici da essa provocati come decessi, macellazioni d'urgenza, perdite di latte e carne, ipofertilità.

Non è ancora ben noto il ruolo di Map come agente eziologico di zoonosi.

Non sono ancora chiari i meccanismi di diffusione della paratubercolosi e nel nostro Paese non sono stati eseguiti piani di monitoraggio su scala nazionale a differenza di quanto avvenuto in altre nazioni.

Parte I  
Parte generale

# CAPITOLO 1

## CENNI STORICI

### 1.1 Storia della Paratubercolosi

All'inizio del 1826 è stata riconosciuta una malattia cronica intestinale debilitante delle vacche che non aveva le caratteristiche o l'eziologia di alcun'altra malattia conosciuta in quel momento. Tuttavia, fu solo dopo il 1894 che venne riconosciuta come malattia infettiva con un'unica causa eziologica.

#### LA SCOPERTA DA PARTE DI JOHNE E FROTHINGHAM

Nel 1894 nella regione di Oldenburg in Germania un veterinario locale esaminò una vacca che non produceva una quantità soddisfacente di latte e non aumentava di peso. Notando la diarrea e la perdita di peso sospettò tubercolosi intestinale, tuttavia la vacca risultò negativa al test della tubercolina. Quando l'animale morì il dottore inviò gli intestini all'unità di patologia veterinaria di Dresda. Là i tessuti furono esaminati dal dottor H.A. Johne e dal dottor L. Frothingham. Essi notarono che la mucosa intestinale era ispessita e i linfonodi mesenterici aumentati di volume. Ad un esame istologico, trovarono una massa intestinale pesantemente infiltrata da leucociti e cellule epiteloidi con occasionali cellule giganti. Utilizzando un colorante specifico, furono notati abbondanti batteri acido-resistenti nei tessuti trattati. Sebbene gli organismi sembrassero quelli responsabili della tubercolosi, questi, dopo essere stati iniettati in porcellini d'India, non provocarono la malattia. Johne e Frothingham conclusero che la malattia osservata nella vacca era stata causata dal batterio che provoca la tubercolosi negli uccelli (*Mycobacterium avium*) e in ragione della similarità patologica alla tubercolosi intestinale (normalmente causata dal batterio che provoca la tubercolosi nelle vacche, *Mycobacterium*

*bovis*), proposero per la malattia il nome di enterite pseudotubercolare.

1910-1930

Intorno al 1910 in Danimarca, O.Bang scoprì che gli animali con la paratubercolosi rispondevano debolmente, o addirittura per niente, a iniezioni sottocute di antigeni preparati dal bacillo della tubercolosi (*Mycobacterium bovis*), ma rispondevano bene alla tuberculina aviare (antigeni preparati dal *Mycobacterium avium*). Sulla base di questa osservazione Bang suggerì che la tuberculina potesse essere usata per i test diagnostici sugli animali. Ciò perfino prima che il batterio che causa la paratubercolosi fosse isolato da colture di laboratorio e fosse riconosciuto essere correlato al batterio che causa la tubercolosi negli uccelli. La differenza stava nel fatto che la causa della tubercolosi aviare poteva essere sviluppata in laboratorio in colture, mentre il batterio che causa la paratubercolosi no.

Nel 1911, durante le prove di coltura del batterio che causa la paratubercolosi, una fortunatissima osservazione dello scienziato britannico F.W. Twort portò ad isolare l'agente eziologico. Il fallimento di Twort nel pulire efficacemente i vetrini di laboratorio ed un occhio perspicace, portarono all'osservazione di piccole colonie batteriche che crescevano come satelliti attorno a colonie più grandi in vecchie colture che si stava preparando a scartare. Le colonie più grandi erano contaminate dal comune bacillo del fieno, *Mycobacterium phlei*. Sospettando che i batteri di *M.phlei* fornissero qualche nutrimento essenziale, Twort incorporò un preparato pastorizzato dell'organismo nel suo brodo di coltura. Questo nuovo brodo di coltura che egli scoprì, poté far crescere un nuovo batterio acido-resistente che denominò *Mycobacterium enteriditis chronicae pseudotuberculosis bovis Johne*. Nel 1912, H.Holth isolò con successo la causa della paratubercolosi.

Dopo che l'agente eziologico poté essere coltivato in laboratorio, si ottennero antigeni per i test cutanei e per le prove al fine di identificare anticorpi nei campioni di siero utilizzando la fissazione del complemento e tecniche di agglutinazione.

Negli anni venti, la paratubercolosi fu riscontrata in animali dei continenti africani ed asiatici. Valle e Rinjard riconoscendo che l'iniezione sottocutanea di *M. paratuberculosis* non procurava malattia, valutarono che la vaccinazione fosse il mezzo per controllare il diffondersi della paratubercolosi.

Nel 1923, fu pubblicata la prima edizione del Bergey's Manual of Determinative Bacteriology che chiamò ufficialmente l'agente causale della paratubercolosi *Mycobacterium paratuberculosis*.

1930-1950

La paratubercolosi fu riscontrata in Sud America e nel continente indiano negli anni Trenta. Questo decennio portò alla consapevolezza che la paratubercolosi costituiva una minaccia per l'allevamento dei bovini e che si dovesse prestare attenzione al suo continuo diffondersi. Numerosi furono gli studi durante gli anni Trenta relativi l'osservazione della resistenza all'infezione da *M. paratuberculosis* in funzione dell'età.

Negli anni Quaranta la paratubercolosi fu riconosciuta come problema non solo per gli allevamenti ma anche per gli animali selvatici.

1950-1970

La vaccinazione, come metodo di controllo della paratubercolosi, fu oggetto di studio negli anni Cinquanta. Inoltre, furono riconosciuti in questo decennio vari ceppi di *M. paratuberculosis*, incluse varianti pigmentate e ceppi che non si sviluppavano con brodi colturali artificiali.

Negli anni Sessanta la giovane disciplina scientifica dell'Immunologia, utilizzò le proprie tecniche per lo studio della paratubercolosi. Furono valutati ulteriori test diagnostici così come la migrazione leucocitaria e i test di fluorescenza anticorpale. In questi anni furono fatte importanti osservazioni epidemiologiche:

- animali clinicamente normali, ma infetti (portatori), espellevano attivamente nelle loro feci *M. paratuberculosis*;
- il *M. paratuberculosis* poteva essere trovato nel seme di tori infetti e nell'utero di vacche infette indicando la possibilità di infezione dei feti intra o trans-uterina.

DAL 1990 AI NOSTRI GIORNI

La nuova era della ricerca sulla paratubercolosi si caratterizza con la scoperta di un unico elemento genetico di *M. paratuberculosis*. Questa sequenza nucleotidica nel DNA cromosomico del microrganismo fu scoperta nel 1989. La sequenza si scoprì essere un elemento di inserzione e fu denominata *IS900*. Fu il primo elemento di inserzione mai riportato nei micobatteri. L'importanza di questa scoperta fu che rese possibile lo sviluppo di chiavi genetiche per l'individuazione di *M. paratuberculosis* senza dover coltivare il batterio in brodi di coltura di laboratorio, un procedimento che richiede normalmente da 12 a 16 settimane.

Oggi, le sequenze genetiche basate su *IS900* forniscono nuove informazioni sull'ecologia e sull'epidemiologia di questo patogeno intestinale. Più provocatori sono gli studi nei quali *M. paratuberculosis* è stato isolato nei tessuti

di oltre metà dei casi di Morbo di Crohn nell'uomo. Questa malattia intestinale cronica e non trattabile ha forti similarità cliniche e patologiche con la paratubercolosi.

Il primo caso di paratubercolosi segnalato in letteratura nei piccoli ruminanti è stato nel 1911 da Stockman [1] nelle pecore e nel 1924 nelle capre.



Figura 1.1: Heinrich Albert Johne. Nel 1894 insieme a Frothingham fu il primo a descrivere la malattia oggi conosciuta con il nome di paratubercolosi.

## CAPITOLO 2

# PARATUBERCOLOSI

### 2.1 Agente eziologico:

#### *M. avium* subsp. *paratuberculosis*

##### COLLOCAZIONE TASSONOMICA DEL GENERE MYCOBACTERIUM

L'agente eziologico della paratubercolosi, conosciuta anche come "malattia di Johne", è il *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (Map).

Secondo il Bergey's manual (1994) [2], il gruppo dei micobatteri viene descritto come un unico genere (*Mycobacterium*) formato da microrganismi allungati, bastoncellari, caratteristicamente acido-resistenti, aerobi, per lo più a crescita lenta, che vivono liberi in natura o parassiti dei vertebrati.

La proprietà di resistere agli acidi, tipica dei micobatteri, è determinata dalla presenza di sostanze cerosi (esteri di acidi micolitici) sulla parete cellulare che li rendono positivi alla colorazione di Ziehl-Neelsen ma di difficile colorazione con il metodo di Gram. Tali sostanze rappresentano circa il 60% del peso secco e conferiscono al batterio notevole idrofobicità, resistenza ad acidi, disinfettanti, anticorpi ed essiccamento (Scatozza e Farina, 1998 [3]).

La recente sistematica colloca il genere *Mycobacterium* all'interno della famiglia delle *Mycobacteriaceae* facente parte della classe delle *Actinobacteridae* (vedi tabella 2.1).

La tassonomia, non solo dei micobatteri, ha subito, negli ultimi anni, notevoli cambiamenti legati principalmente al passaggio dall'approccio fenotipico a quello genotipico. La classificazione dei micobatteri fondata sul fenotipo si basa sull'analisi di caratteri colturali (velocità di crescita, pigmentazione delle colonie, temperatura di crescita) e di caratteri biochimici (soprattutto atti-

<b>Regno</b>	<i>Bacteria</i>
<b>Tipo</b>	<i>Actinobacteria</i>
<b>Classe</b>	<i>Actinobacteridae</i>
<b>Ordine</b>	<i>Actinomycetales</i>
<b>Sottordine</b>	<i>Corynebacterineae</i>
<b>Famiglia</b>	<i>Mycobacteriaceae</i>
<b>Genere</b>	<i>Mycobacterium</i>

Tabella 2.1: Inquadramento tassonomico dei micobatteri.

vità metaboliche) come mostrato in tabella 2.2.

La tassonomia basata sul genotipo si è sviluppata in seguito all'individuazione, all'interno del genoma, di regioni conservate. Si definiscono conservate quelle regioni che, regolando funzioni essenziali, hanno subito meno variazioni durante l'evoluzione; esse costituiscono il target ideale per gli studi tendenti ad evidenziare affinità o diversità tassonomicamente utili. A differenza di quanto avviene nelle regioni variabili, in cui le diversità sono talmente estese da risultare ininterpretabili a fini classificativi, nelle regioni conservate le mutazioni a livello di singole basi risultano altamente informative (tabella 2.3). La conseguenza più appariscente del passaggio dalle analisi fenotipiche a quelle genotipiche è stato l'aumento esplosivo del numero di specie facenti parte del genere *Mycobacterium*. Ad oggi quelle ufficialmente riconosciute sono quasi 130, circa il doppio di quelle conosciute appena 15 anni fa. Se è vero che la maggior parte delle specie "classiche", definite in base ai caratteri fenotipici, sono state confermate dagli studi genetici, è anche vero che in molti casi si è assistito al frazionamento di alcune di esse in due o più entità tassonomiche.

Nel genere *Mycobacterium* esistono vari raggruppamenti, che vengono ricordati comunemente. Nota a tutti è la classificazione di Runyon (1970) che, almeno per finalità didattiche, ha una certa utilità ancora oggi. Essa ripartisce le specie del genere *Mycobacterium* in quattro gruppi basati sulla velocità di crescita e sulla pigmentazione delle colonie (tabella 2.4).

Da un punto di vista clinico risulta più utile una classificazione volta a raggruppare specie non facilmente differenziabili, nonché simili per il loro ruolo patogeno, in *cluster* noti anche con il termine di complex. I principali complex sono riportati in tabella 2.5.

Specie (o complesso)	Velocità di crescita	Pigmento
<i>M. abscessus</i>	R	N
M. avium complex	L	N
<i>M. celatum</i>	L	S
<i>M. chelonae</i>	R	N
<i>M. flavescens</i>	L	S
<i>M. fortuitum</i>	R	N
<i>M. gordonae</i>	L	S
<i>M. kansasii</i>	L	S
<i>M. malmoense</i>	L	N
<i>M. marinum</i>	L	F
<i>M. mucogenicum</i>	R	N
<i>M. scrofulaceum</i>	L	N
<i>M. simiae</i>	L	F
<i>M. smegmatis</i>	R	N
<i>M. szulgai</i>	L	S
M. terrae complex	L	N
M. tuberculosis complex	L	N
<i>M. xenopi</i>	L	S

Tabella 2.2: Caratteri fenotipici delle principali specie micobatteriche. L=Lenta; R=Rapida; F=Fotoindotto (micobatterio fotocromogeno); N=Non presente (micobatterio non cromogeno); S=Non fotoindotto (micobatterio scotocromogeno).

CARATTERI COMUNI E DIFFERENZIALI TRA I MICOBATTERI ATIPICI E I MICOBATTERI CLASSICI

Al microscopio i micobatteri, in generale, si possono presentare come bastoncini dritti o leggermente incurvati, delle dimensioni di 0,2–0,7 micron per 1–10 micron. La crescita, che avviene in 2–60 giorni, si può presentare talvolta pigmentata in vario modo, dal giallo all'arancio. Il pigmento non diffonde. Resistono al lisozima e sono positivi nelle reazioni di catalasi e aril-sulfatasi. Quasi tutti questi bacilli esigono terreni arricchiti con proteine all'uovo, acido oleico, albumina e necessitano comunque di qualche giorno in più dei

Gene	Prodotto	Variabilità
rDNA 23S	rRNA 23S	minima
rDNA 16S	rRNA 16S	bassa
hsp65	proteina da shock termico da 65 kDa	medio- bassa
rpoB	subunità $\beta$ della RNA-polimerasi	media media
sodA	superossido-dismutasi	media
International Transcribed Spacer	nessuno	medio-alta

Tabella 2.3: Principali regioni conservate del genoma micobatterico.

Crescita lenta	Fotocromogeni	Gruppo I	<i>M. kansasii</i> <i>M. marinum</i>
	Scotocromogeni	Gruppo II	<i>M. gordonae</i> <i>M. scrofulaceum</i> <i>M. xenopi</i>
	Non cromogeni	Gruppo III	<i>M. avium</i> <i>M. intracellulare</i> <i>M. terrae</i>
Crescita rapida	fotocromogeni o scotocromogeni o non cromogeni o	Gruppo IV	<i>M. abscessus</i> <i>M. chelonae</i> <i>M. fortuitum</i>

Tabella 2.4: Classificazione di Runyon

tradizionali batteri per sviluppare. Alcune tra le diverse specie di micobatteri, tra cui Map sono più difficili da coltivare in laboratorio e richiedono un supplemento di crescita (Mycobactin).

Oltre al tipo di patogenicità, storicamente i caratteri distintivi degli atipici rispetto ai tubercolari classici (*M. tuberculosis* e *M. bovis*) sono: la pigmentazione delle colonie sui terreni, il tempo di crescita (spesso più breve) e la diversa patogenicità verso gli animali da esperimento (Zavanella, 2012 [4]).

Complessi	Specie
Mycobacterium tuberculosis complex	<i>M. tuberculosis</i> ; <i>M. bovis</i> ; <i>M. africanum</i> ; <i>M. pinnipedii</i> ; <i>M. microti</i> ; <i>M. caprae</i>
Mycobacterium avium complex	<i>M. avium</i> ; <i>M. intracellulare</i> ; <i>M. colombiense</i>
Mycobacterium terrae complex	<i>M. terrae</i> ; <i>M. nonchromogenicum</i> ; <i>M. hiberniae</i> ; <i>M. kumamotoense</i>
Mycobacterium fortuitum complex	<i>M. fortuitum</i> ; <i>M. peregrinum</i> ; <i>M. porcinum</i>

Tabella 2.5: I principali complex del genere *Mycobacterium*.

CARATTERISTICHE DEL *M. AVIUM* SUBSP. *PARATUBERCULOSIS* (MAP)

Le specie *M. avium* e *M. intracellulare* non sono differenziabili sotto il profilo morfologico, colturale, biochimico e perciò sono riunite in un unico *complex*, ricco di 28 sierotipi. Difatti, sierologicamente, i tipi da 1 a 3 sono attribuiti alla specie *M. avium*, quelli da 4 a 28 alla specie *M. intracellulare* (Zavanella, 2012 [4]).

Nella specie *M. avium* sono state proposte tre ulteriori divisioni, sulla base degli acidi nucleici e dei caratteri fenotipici, in altrettante sottospecie: *avium*, *silvaticum*, *paratuberculosis*, quest'ultimo è l'agente eziologico della malattia di Johne.

*M. avium* subsp. *paratuberculosis* (Map) è un batterio di piccole dimensioni (0,5 x 1,5  $\mu\text{m}$ ), acido-resistente, non sporigeno, immobile, aerobio. Per la crescita in vitro richiede la presenza di un agente chelante il ferro, il mycobactin, che ne permette l'assorbimento da parte della cellula; tale dipendenza è una caratteristica comune a quasi tutti i ceppi MAP conosciuti, ma può essere espressa da altri ceppi appartenenti a *M. avium* group, come *M. avium* subsp. *silvaticum* ed alcuni ceppi di *M. avium* subsp. *avium* (Thorel, 1990 [5]).

Un'altra caratteristica differenziale di Map è la sua lenta crescita, che richiede 4–16 settimane a 37°C per i ceppi bovini, ma può arrivare a 8 mesi per i ceppi ovis, o a periodi ancora più prolungati per i ceppi di origine umana. Non si moltiplica nell'ambiente, ma solo nelle specie animali recettive, dove trova un habitat favorevole all'interno dei macrofagi.

Gruppi di Runyon	Specie	Bovini	Suini	Equini	Ovicapriini	Avicoli	Animali selvatici	Pesci	Rettili/ Anfibi	Cane e Gatto
Fotocromogeni	<i>kansasii</i>	x	x		x	x				
	<i>marinum</i>							x	x	x
	<i>simiae</i>							x		
	<i>asiaticum</i>	x								
Scotocromogeni	<i>scrofulaceum</i>	x			x	x		x		
	<i>ulcerans</i>								x	x
	<i>szulgai</i>	x								
	<i>xenopi</i>	x	x			x	x		x	x
	<i>flavescens</i>	x								
	<i>gordonae(aquae)</i>	x						x		x
Non cromogeni	<i>avium</i>	x	x	x	x	x		x	x	x
	<i>intracellulare</i>	x	x	x	x	x		x	x	x
	<i>paratuberculosis</i>	x	x	x	x	x		x	x	x
	<i>malmoense</i>									
	<i>haemophilum</i>									
	<i>gastri</i>									
A rapida crescita	<i>triviale</i>									
	<i>terrae</i>		x					x		
	<i>fortuitum</i>	x	x	x	x	x	x			x
	<i>chelonae</i>	x	x							
	<i>phlei</i>		x							
	<i>vacciae</i>	x								

Tabella 2.6: Principali micobatteri non tubercolari (MOTT) negli animali.

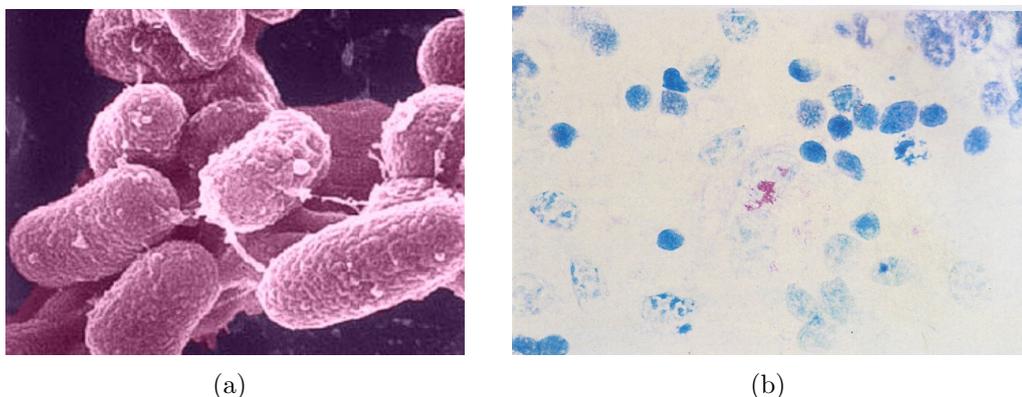


Figura 2.1: (a) Scansione lineare al microscopio elettronico: si noti che il batterio cresce in aggregati (*clumps*) ed ha una parete cerosa che gli conferisce notevole resistenza. (Foto da the University of Wisconsin). (b) Preparato di materiale patologico con presenza di *M. avium* subsp. *paratuberculosis* (colorazione di Ziehl-Neelsen). Il germe è presente nei macrofagi. (Foto da Scatozza e Farina [3])

#### TOLLERANZA AL CALORE

Tra i micobatteri il Map è il più resistente agli agenti fisici e chimici (Schulze et alii, 1992 [6]; Sung, 1998 [7]). Animali infetti eliminano il microrganismo oltre che con le feci anche con il latte (Streeter, 1995 [8]; Sweeney, 1992 [9]; Taylor, 1981 [10]) ed è stata dimostrata la sopravvivenza del micobatterio alla pasteurizzazione (Chiodini, 1993 [11]; Grant, 1996 [12]; Keswani, 1998 [13]; Stabel, 1997 [14]; Sung, 1998 [7]).

#### RESISTENZA AGLI ULTRAVIOLETTI

Gli studi di Schroen nel 2000 [15] hanno dimostrato che la luce ultravioletta ha effetti minimi sulla sopravvivenza di *M. avium* subsp. *paratuberculosis* inoculato nel terreno.

#### SOPRAVVIVENZA IN FECI E SUOLO

All'aria aperta Map sopravvive tra i 152 e 246 giorni. Per cui il pascolo deve essere considerato una fonte di contagio per oltre un anno dalla disseminazione di batteri nel terreno (Lovel, 1944 [16]). Molti fattori del terreno riducono la sopravvivenza del micobatterio: terreni asciutti, esposti alla luce del sole (Larsen, 1956 [17]), con pH inferiore a 7.0 e basso contenuto in ferro (Johnson, 1997 [18], 1998 [19], 1999 [20]).

## SOPRAVVIVENZA IN ACQUA

Molti Autori hanno verificato la notevole resistenza del micobatterio nell'acqua: fino a 485 giorni in acqua del rubinetto a temperature tra 4 e 20 °C (von Reyn, 1994 [21]). In condizioni naturali, l'acqua a pH basso è stata associata ad un alta carica batterica (Iivanainen 1993 [22]; Kirschner, 1992 [23]; Papatropoulou, 1997 [24]), per cui l'acqua è da considerarsi come una fonte di infezione.

## RESISTENZA AL CLORO

*M. avium* subsp. *paratuberculosis* è più resistente di altri batteri al trattamento dell'acqua mediante clorazione (Taylor, 2000 [25]). Inoltre uno studio di Grant nel 2006 [26] ha dimostrato la sopravvivenza e la moltiplicazione del micobatterio all'interno di protozoi acquatici (es. *Acanthamoeba* spp.) che ne aumentano ulteriormente la loro resistenza.

## RESISTENZA A PH BASSO

Lovell nel 1944 [16] ha dimostrato la sopravvivenza del micobatterio fino a 8–9 mesi in acqua distillata, acqua di rubinetto e di fonte a pH rispettivamente di 6.4–6.8, 7.1–8.0 e 5.3–5.9 non rilevando differenze significative nella crescita batterica.

Nei ruminanti le indagini molecolari (Polimerase Chain Reaction, PCR) hanno evidenziato la presenza di 3 distinti ceppi con localizzazione geografia diversa (Collins 1990 [27], 1993 [28]). Un primo ceppo, ampiamente diffuso, consiste in quello isolato primariamente dai bovini; in colture fecali tale ceppo necessita di un periodo di incubazione di 6–12 settimane. Il secondo gruppo consiste in micobatteri isolati prevalentemente da pecore e capre; l'isolamento da colture fecali e da tessuti intestinali di questo gruppo risulta estremamente difficile nonostante il grande numero di bacilli acido resistenti che si ritrovano presenti (Collins, 1990 [27]). Esiste infine un terzo gruppo con caratteristiche intermedie ai primi due ed è stato isolato in pecore proveniente dall'Islanda, Canada e Sud Africa (De Lisle, 1992 [29]).

## 2.2 Epidemiologia

La paratubercolosi è una malattia cosmopolita, a carattere endemico, particolarmente frequente in aree umide e temperate. Ben documentati risultano i danni da essa determinati, anche quando decorre in forma asintomatica, specie nelle bovine da latte, tra le quali si segnala anche una maggiore inci-

denza di casi di mastite (Lombard, 2011 [30]). Nelle zone in cui la malattia è endemica, *M. avium* subsp. *paratuberculosis* può ritrovarsi nelle feci del 15–20% degli animali anche in assenza di manifestazioni cliniche conclamate. Oltre ai ruminanti domestici, l'infezione colpisce numerose specie di ruminanti selvatici: cervi, alci, antilopi e camelidi (Ferroglio, 2000 [31]; Steheman, 1996 [32]), che possono fungere da serbatoi dell'agente causale e quindi da fonte di contagio per i ruminanti domestici. Judge e collaboratori nel 2005 hanno dimostrato che il coniglio selvatico (*Oryctolagus cuniculus*) è un portatore asintomatico dell'infezione e elimina un sufficiente numero di batteri nelle feci così che un solo pellet fecale è in grado di costituire una dose infettante per un bovino, rappresentando quindi un grande rischio di trasmissione di *M. avium* subsp. *paratuberculosis* ai ruminanti domestici (Judge, 2005 [33]). Sporadicamente Map è stato isolato in un basso numero di animali non ruminanti come la lepre bruna, il ratto bruno, le arvicole, mentre cavie, ratti e topi sono resistenti all'infezione. È stato inoltre provato che suini e cinghiali sono talora ospiti alternativi di Map (Boadella, 2011 [34]).

In allevamenti infetti si possono avere sia casi conclamati di malattia che casi di infezione subclinica, questi ultimi particolarmente pericolosi sul piano epidemiologico. Di norma circa il 50% dei soggetti elimina Map in assenza di sintomi evidenti mentre gli animali infetti che manifestano forme cliniche rappresentano nel tempo una quota assai modesta (non superiore al 5%). Una delle caratteristiche della malattia è che, una volta penetrata in allevamento, provoca i danni maggiori entro un periodo di tempo limitato, diviene poi endemica, per riapparire sporadicamente soprattutto nelle vacche da 2 a 5 anni di età che entrano in lattazione. Molto spesso colpisce le primipare o le bovine nelle fasi iniziali della seconda lattazione. Sembra infatti comprovato che il passaggio da una forma inapparente di infezione a malattia conclamata sia legato all'attività secretoria della mammella. È raro che vacche adulte presentino segni di malattia; i tori, al contrario, sono molto recettivi e possono presentare, in un'elevata percentuale di casi, evidenti manifestazioni cliniche (Khol, 2010 [35]).

Il ciclo epidemiologico è di tipo orofecale. Come regola generale, l'infezione viene assunta dai neonati sia attraverso la suzione di latte contaminato proveniente da madri infette che dall'ambiente a sua volta pesantemente inquinato, soprattutto in quei allevamenti in cui non sono rispettate correttamente le norme igieniche. Il rischio è naturalmente più elevato per i vitelli che si alimentano alla mammella di vacche con diarrea. Seppur di rado, nella bovina l'infezione si trasmette anche per via diaplacentare. Secondo un parere EFSA del 2004 i dati disponibili indicano che è possibile che una bovina partorisca un vitello vivo contagiato da Map in utero in epoca fetale, ma per il numero esiguo di dati disponibili in letteratura non esistono informazioni che

consentono di valutare la probabilità di infezione dell'embrione o del vitello neonato [36].

La recettività varia chiaramente in rapporto all'età: è massima nei vitelli neonati, media nelle manze in età riproduttiva, pressochè nulla negli adulti. Paradossalmente, nonostante l'agente patogeno venga assunto in giovane età, il quadro sintomatologico si manifesta solo in soggetti adulti, forse per l'importanza nel determinismo della malattia di fattori debilitanti quali per esempio la lattazione e altri eventi legati alla risposta immunitaria.

#### TRASMISSIONE TRANSPLACENTARE

Il *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* si localizza nel tratto intestinale e nei linfonodi mesenterici degli animali infetti. Mentre fino a qualche anno fa si credeva che la paratubercolosi riguardasse solo infezioni enteriche, oggi le evidenze mostrano che il microrganismo può disseminarsi in siti extra intestinali come l'utero, la mammella, i linfonodi sopramammari e organi sessuali dei tori e possono quindi essere escreti direttamente con il latte e con il seme (Sweeney, 1996 [37]). La disseminazione del microrganismo aumenta con l'estendersi dell'infezione nell'organismo dell'animale. La trasmissione transplacentare o in utero fu dimostrata per la prima volta nel 1935 e studi successivi dimostrarono che il 20–40% dei feti di bovine infette si erano infettati in utero (Sweeney, 1992 [38]). Generalmente i feti infetti provenivano da bovine che mostravano i segni clinici della paratubercolosi (perdita di peso, diarrea), ovvero bovine ad uno stadio di infezione avanzato. Comunque la maggior parte degli animali infetti non mostra segni clinici della malattia anche se dissemina il microrganismo con le feci. Alcuni studi su feti di bovine asintomatiche hanno confermato che la trasmissione avviene anche in queste bovine, seppur con minor frequenza rispetto alle bovine sintomatiche.

#### TRASMISSIONE ORIZZONTALE

Dopo un lungo periodo di incubazione (anni) i bovini infetti iniziano a eliminare Map con le feci e tale eliminazione aumenta col progredire dell'infezione nell'organismo. Un animale adulto con segni clinici di paratubercolosi può eliminare milioni di microrganismi ogni giorno. Alcuni studi hanno dimostrato che Map può persistere nell'ambiente sia nel terreno che in acque correnti e liquami per più di un anno. Gli animali giovani sono generalmente considerati più suscettibili all'infezione anche se l'intensità dell'infezione è in funzione sia dell'età che della dose di microrganismo ingerita.

La trasmissione orizzontale di Map può avvenire per ingestione orale di feci e di latte. Una grande suscettibilità all'infezione dei soggetti neonati può essere relazionata all'alta permeabilità della barriera intestinale nelle prime 24 ore

dopo la nascita, quando anche le macromolecole, come le immunoglobuline del colostro, possono penetrare la mucosa per assorbimento. Probabilmente durante questo periodo la barriera della mucosa intestinale è meno efficace contro *M. avium* subsp. *paratuberculosis*.

#### ALTRI METODI DI TRASMISSIONE

Altri metodi di infezione includono la trasmissione attraverso il seme infetto dei tori (Larsen, 1981 [39]; Khol, 2010 [35]) anche se in letteratura si riscontrano pareri discordanti (Parere EFSA, 2004 [36]); la trasmissione con l'embrio transfer (Rohde, 1990 [40]) e la trasmissione attraverso le procedure veterinarie di esplorazione rettale (Sweeney, 1996 [37]).

#### TRASMISSIONE DA ALLEVAMENTO A ALLEVAMENTO

Come già ampiamente discusso, a causa del lungo periodo di incubazione, i bovini infetti possono non mostrare segni clinici per anni, e spesso risultare negativi alle prove sierologiche e alle colture fecali. Tali animali vengono così ritenuti sani e possono essere venduti ad altri allevamenti a scopo di rimonta e successivamente, quando inizia l'eliminazione del microrganismo, fungono da disseminatori dell'infezione in tutta la mandria.

Questo tipo di trasmissione può avvenire per scambio di veicoli, di attrezzature e di vestiti contaminati con le feci.

## 2.3 Patogenesi

Una volta ingerito, il micobatterio si localizza nella parete intestinale dell'ileo e del colon e in queste sedi avviene la replicazione batterica. Il batterio infetta per endocitosi le cellule M che stazionano nella placche del Peyer ileali, viene veicolato attraverso l'epitelio mucosale e quindi fagocitato dai macrofagi subepiteliali. Dal punto di vista istopatologico, circa tre mesi dopo l'infezione si osserva la comparsa di lesioni granulomatose focali localizzate alle regioni interfollicolari delle placche del Peyer ed ai linfonodi mesenterici. Tali lesioni tendono successivamente a interessare tratti mucosali adiacenti (Momotani, 1988 [41]).

Soggetti apparentemente normali possono iniziare molto presto ad eliminare micobatteri con le feci, mentre la malattia può comparire assai più tardi di solito in concomitanza della prima lattazione o della ripresa delle lattazioni. È un fatto acquisito che anche stress di natura climatica o manageriale oppure legati al trasporto degli animali o a infezioni intercorrenti, così come carenze di ferro e rame nella dieta, possono facilitare l'insorgenza delle manifestazioni patologiche.

Map ha sviluppato una varietà di meccanismi per evitare la capacità battericida dei macrofagi attivati. La loro parete, ricca in lipidi e con proprietà idrofobiche, è poco permeabile consentendo al Map di resistere anche in ambienti ostili per molto tempo. Inoltre i sulfatidi, contenuti nella parete possono prevenire la fusione del fagosoma con il lisosoma e può quindi sopravvivere a lungo (alcune settimane) nei macrofagi bovini. In alternativa Map si può ritrovare libero nel citoplasma, completamente separato dal meccanismo battericida dei macrofagi attivati (Chiodini, 1996 [42]).

La sua moltiplicazione nella mucosa intestinale determina inizialmente una reazione di tipo granulomatoso nell'ileo caudale, interessa poi eventualmente il cieco e le porzioni distali del colon fino ad una tardiva compromissione del lume intestinale e dei relativi linfonodi.

Negli stadi avanzati della malattia la parete intestinale si presenta tipicamente ispessita e può assumere dall'esterno anche l'aspetto di una gomema di nave o a scala di corda, per la formazione di grossi ammassi di cellule epitelioidei negli strati profondi della mucosa e della sottomucosa. Solo raramente si ritrova la necrosi linfonodale tipica dell'infezione di natura tubercolare (*M. bovis*), che in taluni animali può coesistere. La presenza nei linfatici delle sierose di numerose cellule epitelioidei determina quasi sempre la loro trasformazione in cordoni perlacei e ispessiti lungo il mesentere; del tutto eccezionale risulta essere la disseminazione attraverso i macrofagi al fegato. Nelle lesioni di natura paratubercolari, così come in quelle di natura tubercolari, si rilevano numerose cellule giganti, a dimostrazione di una reattività locale specifica.

#### RISPOSTA IMMUNITARIA

Map è un patogeno intracellulare. Inizialmente si ha una risposta immunitaria di tipo T helper 1 (Th1) con la produzione di interferon- $\gamma$  e di alcune IgG2. Successivamente con la perdita del controllo dell'infezione si ha una risposta di tipo Th2 (Stabel, 2000 [43]).

Durante la risposta Th1, il micobatterio viene eliminato in basse quantità, ma che possono essere sufficienti per determinare una risposta positiva alla coltura fecale. È stata provata una correlazione tra la comparsa di IgG2 e l'eliminazione di batteri (Nielsen e Toft, 2006 [44]) ma la relazione tra i due eventi non è stata ancora descritta completamente. Infezioni sperimentali nel bovino dimostrano che l'eliminazione batterica decresce per 10–14 mesi dall'infezione, per incrementare più tardi, come dimostrato dalla sieroconversione intorno ai 10 mesi dall'inoculazione (Lepper, 1989 [45]).

In animali infettati naturalmente è stata dimostrata la sieroconversione nel 95–98 % di vacche eliminatrici di Map (Nielsen e Ersbøll, 2006 [46]) e l'età

in cui avviene la sieroconversione è compresa tra 2.2 e 11.7 anni nei bovini. È stato ipotizzato che la notevole variabilità temporale tra il momento in cui avviene l'eliminazione dei batteri e l'incremento della risposta anticorpale sia dovuta alla diversa carica infettante di Map.

Studi che impiegano una carica infettante standard di Map e in cui è noto il momento di infezione sono esitati in una grande variabilità temporale tra l'occorrenza della positività all'esame colturale e la positività al test ELISA (Lepper, 1989 [45]).

L'età dell'animale può essere utilizzata come indicatore dello stadio di infezione: nei giovani animali raramente ci si aspetta di trovare una quantità di batteri rilevante eliminata con feci e hanno anticorpi IgG1, mentre animali più vecchi sono associati ad un'eliminazione più elevata di batteri, aumento del titolo anticorpale e segni clinici evidenti, quindi la probabilità di identificare vacche infette di 2 anni usando un test ELISA indiretto è stata stimata di 0.06, mentre la stessa probabilità sale allo 0.50 in vacche di 5 anni (Nielsen e Toft, 2006 [44]).

La risposta umorale non ha valore protettivo nelle infezioni sostenute da batteri intracellulari. Nonostante questo in alcuni stadi dell'infezione i livelli anticorpali sono molto elevati. In questi casi la presenza di una risposta immunitaria generalmente implica un aumento della proliferazione batterica e una diminuzione della risposta cellulomediata che è protettiva, per cui un aumento di anticorpi è spesso associato a un'anergia della risposta cellulomediata e/o ipersensibilità di tipo ritardato (DTH) (Chiodini, 1996 [42]). Le immunoglobuline contribuiscono alle manifestazioni patologiche della malattia. Gli immunocomplessi possono provocare glomerulonefriti e talvolta infarti renali. La deposizione di immunocomplessi nel tratto intestinale di vacche cronicamente infette può provocare fenomeni di reazioni di ipersensibilità ritardata responsabili dei segni clinici della malattia (Merkal, 1970 [47]).

## 2.4 Sintomatologia

Nel 1992 Whitlock [48] ha determinato una classificazione in modo da poter suddividere gli animali infetti da paratubercolosi in 4 categorie o stadi in base ai seguenti criteri:

- alla gravità dei segni clinici,
- alla quantità di microrganismi eliminata nell'ambiente,
- alla facilità con la quale la malattia può essere diagnosticata con i correnti metodi di laboratorio a disposizione.

Nel suo studio Whitlock ha evidenziato che in una mandria per ogni animale con sintomatologia conclamata altri 25 sono infetti (Whitlock 1992 [48]) e solo dal 15% al 25% di questi animali sono correttamente identificabili come positivi dai test di laboratorio (Gilmour, 1965 [49]). Whitlock ha chiamato questo fenomeno “Effetto *Iceberg*”, la cui punta è rappresentata dagli animali con sintomatologia clinica (figura 2.2).

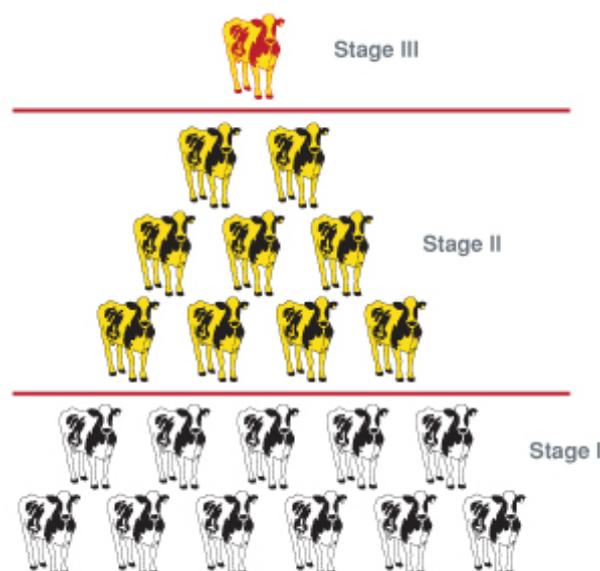


Figura 2.2: “Effetto *Iceberg*”.

#### STADIO I: INFEZIONE SILENTE

I giovani animali infetti da Map allo stadio primario della malattia non manifestano segni di infezione perchè non hanno sintomi clinici. Questi animali non si differenziano dagli animali non infetti della stessa mandria per quanto concerne la crescita, l’incremento ponderale e l’aspetto esteriore.

In questa fase i normali test diagnostici impiegati non sono in grado di identificare gli infetti. I positivi possono essere messi in evidenza solo con tecniche dirette come colture o esami istopatologici da tessuto intestinale o linfonodi.

#### STADIO II: MALATTIA SUBCLINICA

Gli animali adulti con malattia subclinica non mostrano diarrea o altri sintomi della malattia, ma spesso presentano una predisposizione per mastiti e infertilità. A questo stadio solo una percentuale variabile dal 15 al 25%

risulta positiva mentre la maggior parte degli animali risulta ancora negativo ai test colturali poiché eliminano un basso numero di microrganismi ma che tuttavia contribuiscono alla contaminazione ambientale. Questi animali progrediscono molto lentamente fino allo stadio III ma spesso vengono riformati prima per la scarsa produzione.

#### STADIO III: MALATTIA CLINICA

Dopo un lungo periodo di incubazione, da 2 a 10 anni, gli animali infetti mostrano i primi sintomi della malattia: nonostante un appetito normale o addirittura aumentato si ha una graduale perdita di peso, dopo alcune settimane le feci diventano più morbide. All'inizio la diarrea è intermittente, alternata a periodi con feci normali. La sete è aumentata. I segni vitali come temperatura, frequenza cardiaca e respiratoria sono normali. Dopo 3–4 mesi gli animali progrediscono verso il IV stadio della malattia. In rarissimi casi gli animali regrediscono allo stadio II. A questo stadio ci sono delle modificazioni a livello biochimico ma che non sono patognomoniche di paratubercolosi. Si ha una diminuzione nei valori di: proteine totali, albumine, trigliceridi e concentrazioni di colesterolo (Patterson, 1968 [50]; Rice, 1969 [51]; Szilàgyi, 1989 [52]). A seguito di degenerazione muscolare si ha un aumento degli enzimi muscolari (Patterson, 1965 [53]; Szilàgyi, 1989 [52]). A questo stadio molti animali sono positivi alla coltura fecale e ai test sierologici (ELISA, AGID).

#### STADIO IV: MALATTIA CLINICA AVANZATA

A questo stadio gli animali infetti mostrano letargia, debolezza ed emaciazione. Segno caratteristico legato all'ipoproteinemia è l'edema intermandibolare ("*bottle jaw*" fig 2.3(a)). Gli stadi terminali della malattia sono caratterizzati da cachessia e diarrea profusa che portano alla morte per disidratazione. In questa fase si può avere una disseminazione del microrganismo in tutto il corpo dell'animale, molti Autori hanno isolato il micobatterio da: utero, feto, ghiandole sessuali accessorie del maschio e reni (Larsen, 1970 [17], [39]; Kopecky, 1967 [54]; Sweeney 1992 [9], [55]).

L'età al momento della prima infezione sembra essere il maggior determinante di come e quando gli animali svilupperanno la sintomatologia clinica (Chiodini, 1984 [56]). Dal punto di vista epidemiologico il così detto "Effetto *Iceberg*" è significativo perché gli animali allo stadio I e II sono infetti ma difficili da identificare come tali e rappresentano un pericolo per gli animali non infetti, in quanto sono eliminatori del patogeno.

Numerosi studi hanno dimostrato che i giovani animali sono più suscettibili all'infezione e a sviluppare segni clinici di malattia di Johne rispetto ad ani-

mali adulti (Larsen,1975 [57]), questo non vuol dire che gli animali adulti non si infettano ma che pur infettandosi sono più resistenti e mostrano una sintomatologia clinica meno grave rispetto ai giovani infettati con la stessa carica infettante (Taylor, 1953 [10]).

L'ipoprotidemia e l'edema intermandibolare è stato riportato in cervi, camelidi e pecore.



(a) "bottle jaw"



(b) Evidente stato di emaciazione in una vacca malata

Figura 2.3: Sintomatologia clinica

La paratubercolosi deve essere differenziata dalle altre cause di perdita cronica del peso come parassitismi, malattie infettive come ad esempio salmonellosi, clostridiosi, coronaviriosi, febbre catarrale maligna, leucosi enzootica dei bovini e infine da squilibri nutrizionali e metabolici come chetosi, intossicazioni, carenze o eccessi nutrizionali, ma anche reticuloperitonite traumatica cronica, pielonefrite.

## 2.5 Lesioni anatomopatologiche

Le principali lesioni patologiche interessano l'intestino e il sistema linfatico ad esso associato; nei casi di malattia avanzata le lesioni sono accompagnate da marcati segni di cachessia, tra cui atrofia gelatinosa del grasso di deposito e raccolte di siero nelle cavità corporee. Le lesioni macroscopicamente

più evidenti coinvolgono la porzione terminale dell'ileo, ma talvolta digiuno e colon possono essere interessati. L'ileo può presentarsi ispessito e di consistenza pastosa; più frequentemente è visibile solo un lieve ispessimento della lamina basale con una leggera granulosità superficiale associata o meno a lieve congestione vasale. Occasionalmente la mucosa può lacerarsi se viene piegata. Se l'infezione è sostenuta da ceppi cromogeni, lo strato della lamina propria assume una patognomonica colorazione giallo brillante.

I vasi linfatici del peritoneo intestinale e mesenterico possono ispessirsi, divenire convoluti e contenere piccoli noduli biancastri di piccole dimensioni (1–4 mm) i quali possono essere caseosi o calcifici. Noduli simili o macchie biancastre possono essere presenti sulla superficie peritoneale dell'ileo, sulla superficie di taglio della parete intestinale o nei linfonodi mesenterici. Quest'ultimi risultano frequentemente aumentati di volume.

La severità dei segni clinici non è correlata alla gravità delle lesioni anatomopatologiche. Nei bovini, così come nelle pecore e capre, esistono due distinti tipi di lesioni patologiche basati sulla numerosità dei micobatteri e dell'infiltrato cellulare. La forma più comune, conosciuta come forma lepromatosa o multibacillare è caratterizzata da numerosi Map all'interno del citoplasma dei macrofagi che infiltrano la mucosa e che ne determinano l'ispessimento. Linfociti e granulociti sono presenti in basso numero. Occasionalmente si possono riscontrare cellule giganti multinucleate di tipo Langhans. La forma meno comune conosciuta come linfocitica o paucibacillare, è caratterizzata da un più marcato infiltrato linfocitico con cellule giganti e piccoli granulomi disseminati. Le lesioni visibili macroscopicamente possono essere caseose, calcifiche o fibrose.

I due tipi di lesioni anatomopatologiche sono correlate al diverso tipo di risposta immunitaria che l'ospite ha nei confronti del batterio. In particolare è stato notato che le pecore con forma multibacillare mostrano una forte risposta anticorpale ma l'immunità cellulo mediata è molto debole o assente come è confermato da una scarsa ipersensibilità cutanea e dalla predominanza di citochine tipo Th2 (IL-4 e IL-10). La microscopia elettronica rivela che in queste lesioni Map è in grado di replicare nelle cellule epitelioidi. Nelle forme paucibacillari la risposta cellulo-mediata è predominante e si ha una forte ipersensibilità cutanea e una risposta anticorpale scarsa o assente con citochine di tipo Th1 (IL-2 e IFN- $\gamma$ ). In questo tipo di lesione i batteri all'interno dei macrofagi risultano degenerati. Questa forma di risposta sembra riflettere la capacità dell'ospite di contrastare la riproduzione batterica nell'intestino.



Figura 2.4: Lesioni intestinali

## 2.6 Diagnosi

Uno degli ostacoli maggiori al controllo della paratubercolosi è rappresentato dalla difficoltà di una diagnosi certa d'infezione, legata alla scarsa sensibilità dei test diagnostici.

I test di laboratorio utilizzati per la diagnosi di paratubercolosi comprendono esami diretti e indiretti: strisci fecali, colture tessutali e fecali, prove sul DNA di feci e tessuti, sierologia, necropsia e istologia. I test sulla mandria sono eseguiti per determinare la prevalenza dell'infezione intraziendale, così da istituire misure adeguate di controllo. Poiché la sensibilità e la specificità dei test non è del 100% i dispositivi di controllo consistono nel ripetere i test a intervalli di 6 mesi o 1 anno e nell'eliminazione dei positivi ai test sierologici e agli strisci fecali; anche la rimozione delle femmine positive dalla rimonta è considerata prudente. Purtroppo anche l'applicazione di tutte queste procedure non sempre risulta essere sufficiente a ridurre la trasmissione dell'infezione all'interno dell'allevamento senza un miglioramento dell'igiene e della gestione aziendale.

### 2.6.1 Identificazione dell'agente infettivo

#### NECROSCOPIA

La paratubercolosi non può essere diagnosticata con un esame superficiale dell'intestino per segni di ispessimento. Gli intestini devono essere aperti dal duodeno al retto per visualizzare la mucosa. Non c'è sempre una stretta correlazione tra la gravità dei segni clinici e l'estensione delle lesioni intestinali. L'ispezione della mucosa, specialmente nel tratto terminale dell'ileo, può met-

tere in evidenza, ove presente, la patognomonica corrugazione e ispessimento. Tenendo l'intestino contro luce si possono individuare anche delle placche che rappresentano le lesioni nelle fasi iniziali della malattia. Iperemia mucosale, erosioni e petecchie sono state osservate nei cervi con la paratubercolosi. Le lesioni più precoci sono ispessimento e i linfatici assumono un'aspetto a cordone. I linfonodi mesenterici sono di solito ingrossati e edematosi. Strisci dalla mucosa interessata dalle lesioni e tagli dalla superficie dei linfonodi dovrebbero essere colorati con il metodo di Ziehl-Neelsen ed esaminati al microscopio. Non sempre è possibile rinvenire i microrganismi acido resistenti per cui la diagnosi in questi casi deve essere confermata dall'istologia sulle lesioni multiple intestinali e sui campioni di linfonodi. I campioni istologici dovrebbero essere esaminati sia con la colorazione ematossilina-eosina che con la colorazione di Ziehl-Neelsen. Le lesioni tipiche della paratubercolosi consistono nell'infiltrazione della mucosa intestinale, sottomucosa, placche di Peyer e della corticale dei linfonodi mesenterici di macrofagi giganti, conosciuti anche come cellule epitelioidi, e cellule multinucleate giganti. I bacilli acido-resistenti possono essere disposti singolarmente o aggregati [58].

#### BATTERIOLOGIA: ESAME MICROSCOPICO

Gli strisci di feci o di mucosa intestinale colorati con Ziehl-Neelsen vengono esaminati al microscopio. Una diagnosi presuntiva di paratubercolosi può essere fatta se vengono trovati aggregati (tre o più microrganismi) di piccoli bacilli ( $0,5-1,5 \mu\text{m}$ ) fortemente acido resistenti [58]. La soglia di sensibilità della metodica è di 1.000.000/grammo di feci. Perciò tale metodica è applicabile unicamente su campioni prelevati da animali colpiti dalla forma clinica, ma sicuramente non è idonea ad individuare i soggetti eliminatori subclinici nell'ambito dei piani di controllo.

La presenza di singoli bacilli acido resistenti in assenza di aggregati è un risultato inconcludente. Lo svantaggio di questo test è che non differenzia tra altre specie di micobatteri e solo pochi casi possono essere confermati con l'esame microscopico.

#### BATTERIOLOGIA: ESAME COLTURALE

L'esame colturale delle feci è quello che permette una diagnosi più affidabile, in quanto, pur presentando una sensibilità limitata (40-50%), dimostra una specificità assoluta (Withlock, 2000 [59]).

La soglia di rilevazione della metodica è di circa 10-100 micobatteri per grammo di feci, quindi molto più sensibile rispetto all'osservazione microscopica diretta delle feci mediante colorazione di Ziehl-Neelsen. A fronte dell'attendibilità assoluta dell'esame colturale delle feci, non si possono sottacere

i numerosi inconvenienti di tale test, quali i lunghi tempi di attesa per la risposta, i frequenti inquinamenti che ne inficiano il risultato, i costi elevati, la necessità di attrezzature e personale specializzato e dotato di esperienza. La coltura tissutale di grandi e piccoli ruminanti per Map ha una sensibilità maggiore rispetto all'esame istopatologico.

#### PROVE SUL DNA E PCR

Le prove sul DNA si sono sviluppate per la rapidità di identificazione dei batteri isolati e perché permettono di distinguere tra Map e altri micobatteri. McFadden et al. hanno identificato una sequenza chiamata *IS900*, che è una sequenza specifica di *M. avium* subsp. *paratuberculosis* presente solo in pochi altri microrganismi (McFadden, 1987 [60], [61]).

Successivamente l'identificazione di nuove sequenze di DNA, considerate essere uniche per *M. avium* subsp. *paratuberculosis* (ISMav2, f57 e ISMap02), hanno offerto nuove possibilità di identificare il microrganismo usando la PCR (Stabel, 2005 [62]; Strommenger, 2001 [63]; Vansnick, 2004 [64]). Gli enzimi di restrizione per IS1311, una sequenza comune a *M. avium* e Map può essere usata per distinguere tra queste due specie e per tipizzare le catene di *M. avium* subsp. *paratuberculosis* di ovini e bovini. È stato riportato l'uso della PCR su IS900 come una prova di DNA specifica per l'identificazione di Map in campioni fecali di bovini (Vary, 1990 [65]).

### 2.6.2 Test sierologici

I comuni test sierologici usati per la paratubercolosi nei bovini sono la fissazione del complemento, ELISA e AGID.

#### FISSAZIONE DEL COMPLEMENTO (FC)

La fissazione del complemento è stato il test standard usato nei bovini per molti anni. È molto attendibile sugli animali con sospetto clinico di malattia ma non ha sufficiente specificità per essere usato in una popolazione a scopo di controllo.

#### ENZYME-LINKED IMMUNOSORBENT ASSAY (ELISA)

Il test ELISA è, al momento, il più sensibile e specifico per individuare gli anticorpi sierici contro *M. avium* subsp. *paratuberculosis* nei bovini. La sua sensibilità è paragonabile a quella della fissazione del complemento nei casi clinici, ma molto più alta nei portatori infetti con malattia subclinica. La specificità di ELISA è aumentata grazie all'assorbimento nel siero di *M. phlei*. ELISA individua circa il 30-40% dei bovini identificati come infetti

alla coltura fecale (Whitlock, 2000 [59]).

Come il metodo colturale, la sensibilità di ELISA dipende dal livello di eliminazione con le feci di *M. paratuberculosis* e dall'età degli animali. Uno studio eseguito in Australia ha mostrato che la sensibilità di ELISA in gruppi di bovini di 2, 3 e 4 anni era rispettivamente 1,2%, 8,9% e 11,6%, ma rimaneva tra il 20 e 30% in gruppi di età più avanzata (Jubb, 2004 [66]). La sensibilità per tutti i gruppi di età è stata calcolata intorno al 15% (Sergeant, 2003 [67]). Nei piccoli ruminanti uno studio ha dimostrato che i kit commerciali disponibili hanno una specificità del 98,2–99,5 % e individuano il 35–54% di animali con evidenze istologiche di infezione (Hope, 2000 [68]). In un altro studio la stima della specificità è stata del 99% e della sensibilità, misurata in confronto ai risultati istologici del 21,9%.

#### IMMUNODIFFUSIONE IN GEL DI AGAR (AGID)

Il test AGID è utile per la conferma della malattia in sospetti clinici in bovini, pecore e capre (Shermann, 1984 [69]). È stato riportato che nei piccoli ruminanti in Nuova Zelanda e Australia l'AGID offre più alte sensibilità e specificità di quelle ottenute con ELISA (Gwozdz, 2000 [70]; Hope, 2000 [68]; Sergeant, 2003 [67]). La specificità e la sensibilità riportate misurate contro i risultati istologici era rispettivamente del 99–100% e 38–56%.

## 2.7 Diffusione

La paratubercolosi è una malattia a diffusione mondiale ed è stata segnalata in tutti i continenti: Africa, America, Europa, Asia e Oceania.

In Europa sono stati condotti numerosi studi per determinare la prevalenza della paratubercolosi negli allevamenti e negli animali. Da una recente *review* elaborata da Nielsen e Toft nel 2009 in cui sono stati comparati e analizzati tutti i precedenti studi europei, la prevalenza di infezione individuale è risultata essere del 20% o comunque almeno del 3–5% in alcuni Paesi. La prevalenza stimata nelle aziende appare essere maggiore del 50% (Nielsen, 2009 [71]). In tabella 2.9 sono riassunti i risultati dei lavori presi in considerazione.

Nonostante la paratubercolosi bovina risulti svolgere un ruolo rilevante sia da un punto di vista economico che sanitario la bibliografia disponibile sulla diffusione di questa malattia in Italia è molto esigua (tabella 2.7). I lavori più consistenti sono quelli effettuati nel Nord Italia, in particolare in Lombardia e Veneto regioni in cui il patrimonio zootecnico di vacche da latte costituisce più del 50% del patrimonio dell'intero Paese. Recentemente i dati della Lom-

Area geografica	Anno indagine	Metodo diagnostico	% allevamenti positivi	%capi positivi
Sicilia	1989	ELISA	12,4%	1,47%
Prov. Brescia	1989	FdC	60,3%	9,9%
		EC	1,7%	0,13%
Prov. Lodi	1989	ELISA+EC	14,8%	-
Prov. Piacenza	1991	EC	-	2,1%
Veneto	2000/01	ELISA	64,9% (26,7%)	3,5%
Lombardia	2003/04	ELISA+EC	43,7% (19,2%)	2,6%
Lazio	2004	ELISA	42,0%	2,4%

Tabella 2.7: Dati relativi alla paratubercolosi in Italia.

bardia e Veneto sono stati rivalutati applicando un modello Bayesiano (Pozzato, 2011 [72]). I risultati così ottenuti mostrano valori simili a quelli in Nord Europa (tabella 2.8). La discrepanza tra i dati delle due regioni relativi alla

	Lombardia	Veneto
Prevalenza aziende infette	70,1% (50,3–86,8%)	71,3%(54,2–86,7%)
Prevalenza intraziendale	6,7% (4,4–10,6%)	14,3%(9,4–21,7%)

Tabella 2.8: Dati sulla prevalenza aziendale e intraziendale rivalutati applicando un modello Bayesiano (Pozzato et alii, 2011 [72])

prevalenza intraziendale probabilmente è dovuta alla diversa distribuzione di età degli animali nelle diverse aziende.

## 2.8 Impatto economico

Numerosi studi hanno valutato l’impatto economico della paratubercolosi nell’allevamento di bovine da latte. In generale le vacche positive per Map anche se non mostrano segni clinici di infezione hanno una minor produzione latte, un maggior deprezzamento della carcassa e vengono riformate più precocemente rispetto alle vacche negative della stessa mandria. Benché la riduzione della produzione alle prima lattazione non è sempre documentata, la riduzione nella produzione latte delle seguenti lattazioni è un reperto

Paese/Regione	Anni	Età	n	T+	HAP(%)	Autori
Belgio/Tutte	1997-1998	2 aa	458	82	18	Boelaert, 2000
Danimarca/tutte	1998	NA	900	497	55	Nielsen, 2000
Francia/Yonne	1998-1999	tutti	155	105	68	Petit, 2001
Germania/Saxony	2002-2004	?	493	207	42	Donat, 2005
Italia/Lazio	?		369	155	42	Lillini, 2005
Italia/Veneto	2000-2001	>20 mesi	419	272	65	Robbi, 2002
Italia/Verona	1997-1998	?	73	5	7	Vincenzoni, 1999
Norvegia/tutte	2002	5 più vecchie	200	2	10	Merk, 2003
Irlanda/tutte	2000-2001	NA	389	50	13	O'Reilly, 2004
Slovenia/tutte	1997		1690	48	3	Ocepek, 1999
Slovenia/tutte	1998		2423	157	7	Ocepek, 1999
Slovenia/tutte	2000-2001	> 2 aa	302	35	12	Ocepek, 2002
Slovenia/tutte	1999		26088	1055	4	Ocepek, 2002
Spagna/tutte	?	vacche in lattazione	70	7	10	Sevilla, 2002
Spagna/Nord	?	vacche in lattazione	200	16	8	Sevilla, 2002
Svezia/tutte	2000-2001	?	200	0	0	Stenberg, 2003
Svizzera/...	2000-2001	vacche	501	112	22	Stephan, 2002
Svizzera/tutte	1993-1994	?	113	9	8	Stärk, 1997
Svizzera/tutte	2001	vacche	1384	273	20	Corti, 2002
Svizzera/?	2005		100	3	3	Bosshard, 2006
Paesi Bassi/tutte	1998	≥3 aa	371	200	54	Muskens, 2000
Turchia/?		>2 aa	545	206	38	Atala, 2001
UK/Inghilterra e Galles	1995	?	2801	486	17	Cetinkaya, 1998

Tabella 2.9: Prevalenza apparente di Map negli allevamenti bovini in Europa rilevati da studi pubblicati da Gennaio 1990 ad Aprile 2007. Note: n, Numero delle mandrie testate; T+, Numero delle mandrie positive; HAP, prevalenza apparente; NA, non applicabile. Adattato da Nielsen e Toft, 2009 [71].

piuttosto costante. Tale riduzione si aggira dal 4% al 20% rispetto a vacche negative (Benedictus et alii, 1987 [73]; Lombard et alii, 2005 [74]), mentre la perdita economica legata al minor *body score condition* è stata stimata essere del 30% (Lombard et alii, 2005 [74]; Lombard, 2011 [75]).

La perdita economica annuale stimata per malattia di Johne negli Stati Uniti è di circa 200-250 milioni di dollari (Ott et alii, 1999 [76]) e in Europa per ogni vacca con malattia clinica l'allevatore perde 1.940 euro mentre per una vacca con forma subclinica la perdita si aggira a 461 euro l'anno per capo infetto (Dufour et alii, 2004 [77]).

Oltre agli effetti negativi diretti sulla produzione latte non sono da trascurare gli altri aspetti legati all'infezione paratubercolare ovvero possibili vincoli nel commercio di animali da vita e dei prodotti lattiero caseari. Per quanto riguarda l'Italia tale aspetto risulta di notevole importanza in quanto nel primo semestre 2012 l'export di prodotti lattiero caseari italiani è aumentato del 2% rispetto all'anno precedente e nel 2010 il giro d'affari si attestava intorno al milione e mezzo di euro per l'esportazione nel mondo (dati assolate anno 2010 [78]).

Alla luce di questi dati risulta ancora più preoccupante l'interesse nei confronti di Map di alcuni Paesi. In particolare per l'importazione l'India richiede che i prodotti lattiero caseari devono aver subito un trattamento tecnologico di provata efficacia in grado di inattivare Map e la Cina richiede che i prodotti non devono provenire da allevamenti con casi clinici di paratubercolosi.

## 2.9 Vaccinazione

Benché i primi studi relativi alla vaccinazione risalgano agli anni Venti (Vallee e Rinjard, 1926 [79]) e la maggior parte di questi indichi un effetto protettivo dall'infezione di Map e una riduzione della malattia clinica (Larsen, 1978 [57]; Harris, 2001 [80]) questa pratica non è molto diffusa, in quanto presenta effetti negativi non trascurabili.

Attualmente in Italia non esistono vaccini approvati a differenza degli Stati Uniti e Australia. Negli Stati Uniti la vaccinazione viene effettuata nel rispetto di alcuni requisiti: come premessa si deve avere la conferma della presenza dell'infezione (es. almeno un positivo alla coltura fecale o alla PCR individuale o in pools oppure su campioni di feci ambientali); esito negativo di tutti gli animali testabili alla prova della tuberculina; infine il proprietario degli animali e l'autorità competente devono firmare il consenso per l'uso del vaccino. Inoltre prima dell'introduzione di nuovi animali nella mandria vaccinata ogni rimonta esterna deve essere sottoposta alla prova con tuberculina (Patton, 2011 [81]).

Negli Stati Uniti è registrato il Mycopar<sup>®</sup> (Boehringer Ingelheim, Ridgefield, CT, USA) e vengono vaccinati i tori e le vitelle da rimonta con età compresa tra 1 giorno e 35 giorni. Viene somministrato sottocute, nella giogaia in prossimità della punta del petto. Gli animali vaccinati devono essere chiaramente identificati con una identificazione esterna e un tatuaggio all'orecchio sinistro.

Sfortunatamente esistono molti aspetti negativi legati alla vaccinazione quali: rischio di granulomi nel punto di inoculo, rischio per la salute dell'operatore in caso di iniezione accidentale e interferenza nella diagnosi di tubercolosi e paratubercolosi. Per distinguere gli animali vaccinati da quelli infetti devono essere usate colture fecali o PCR e non i comuni test ELISA, per contenere i costi queste 2 analisi possono essere fatte su campioni di pool (van Schaik, 2003 [82]).

Il vaccino deve essere utilizzato in mandrie con un'elevata prevalenza di infezione Map oppure in quelle aziende che non riescono ad ottenere un buon management in grado di ridurre il ciclo di trasmissione della malattia.

La vaccinazione per la paratubercolosi non previene tutte le nuove infezioni; l'efficacia dipende dall'età dell'esposizione e della vaccinazione, il carico di Map ambientali, management aziendale. La maggior parte degli studi concorda su fatto che la vaccinazione riduca la sintomatologia clinica, l'escrezione fecale di Map e la diffusione tissutale rispetto ai controlli non vaccinati (Harris, 2001 [80]). La vaccinazione deve essere quindi affiancata a pratiche di buon management quindi deve essere considerata una parte del programma di controllo e non l'intero programma.

In Australia nell'ambito di un progetto nazionale (Australia's Ovine Johne's Disease Management Plan) è stato utilizzato il vaccino Guidar<sup>®</sup> (Pfizer, NSW, Australia) che ha dimostrato di ridurre nel 90% dei casi i segni clinici della malattia nelle pecore, di ridurre del 90% l'eliminazione fecale di Map e in pecore già eliminatrici di ritardare l'eliminazione fecale di un anno rispetto ai controlli non vaccinati (Reddacliff, 2006 [83])

Anche per questo vaccino sono stati riscontrati granulomi ma che non hanno determinato un deprezzamento della carcassa. Lo stesso vaccino è autorizzato per le capre.

In Australia viene impiegato per i bovini il nuovo vaccino Silirum<sup>®</sup> (Pfizer, NSW, Australia) che ha recentemente mostrato di ridurre l'eliminazione fecale e di incrementare la produzione latte rispetto alle mandrie non vaccinate (Juste, 2009 [84]).

## 2.10 Piani di controllo

Piani di controllo nazionali sono già presenti in Olanda, Francia, Canada e USA, ma a livello europeo non ci sono né linee guida né indirizzi comunitari. Attualmente in Italia l'unica normativa di riferimento è il Regolamento di Polizia Veterinaria approvato con D.P.R. n. 320/1954, all'art. 68, come modificato dalla Legge 23 Gennaio 1968. Recentemente è in corso la stesura di un piano nazionale di controllo e certificazione ispirato al programma volontario della provincia di Lodi denominato "Programma volontario di certificazione per la paratubercolosi bovina (pvcpb)" (deliberazione 113 del 23/04/2007 del Dir. Gen. A.S.L. di Lodi) [85] e al manuale per il controllo della paratubercolosi negli allevamenti di bovine da latte [86] elaborato dal Centro di Referenza Nazionale della paratubercolosi.

La proposta prevede interventi di carattere istituzionale come un'eventuale notifica del caso clinico all'autorità competente la quale provvede alla registrazione in Banca Dati Nazionale (BDN) e la messa in atto di tutti i provvedimenti conseguenti come ad esempio il blocco delle movimentazioni per gli allevamenti con casi clinici.

Il manuale, ispirato ai piani di controllo europei, ha lo scopo di fornire linee guida per l'impostazione di un programma di controllo della paratubercolosi negli allevamenti di bovine da latte.

Il programma di controllo si basa su sette azioni tra loro interdipendenti, di cui una opzionale.

La stesura del Piano per la Gestione Sanitaria (PGS) aziendale rappresenta il momento conclusivo di programmazione operativa a cui dovrà attenersi l'allevatore per gli interventi da adottare in allevamento.

### **Azione 1: Raccolta di informazioni sullo stato sanitario e produttivo dell'allevamento**

La definizione di interventi gestionali volti al controllo della paratubercolosi dovrà prendere in considerazione le altre problematiche sanitarie eventualmente presenti in allevamento, per cui è necessaria la raccolta e l'analisi dei dati relativi allo stato sanitario e alla performances produttive dell'allevamento, relativamente a: presenza di altre infezioni subcliniche, incidenza di patologie nella mandria e scostamento tra performances produttive raggiunte rispetto a quelle attese.

### **Azione 2: Raccolta dell'anamnesi relativa alla paratubercolosi e stima della prevalenza di infezione**

Questa fase consiste nella raccolta dell'anamnesi dell'allevamento relativamente alla paratubercolosi e nella stima della prevalenza dell'infezione. Quest'ultima è fondamentale per dare priorità agli interventi da includere nel

PGS e per l'interpretazione dei risultati dei test.

I risultati di un test diagnostico effettuato su tutto l'allevamento sono in grado di fornire una valutazione accurata della prevalenza. Se tali dati non sono disponibili, la prevalenza può essere stimata in base ai dati anamnestici raccolti.

### **Azione 3: Analisi del rischio per la trasmissione di infezione paratubercolare in allevamento**

Questa azione è il punto più importante per la definizione del PGS. Si basa sull'identificazione, in ogni fase dell'allevamento, dei fattori di rischio per la diffusione dell'infezione paratubercolare.

L'analisi del rischio prevede un punteggio per ogni fase, allo scopo di fornire una valutazione più oggettiva possibile. Viene stabilito un livello di rischio più elevato per i vitelli, e via via più basso per gli animali di età crescente, in funzione della minore recettività all'infezione con l'aumentare dell'età.

### **Azione 4: Test diagnostici**

In una fase iniziale i test possono servire per verificare se l'infezione è presente in allevamento e negli allevamenti infetti consentono di: identificare gli animali infetti allo scopo di eliminarli o gestirli, stimare la prevalenza dell'infezione in allevamento, valutare il rischio legato all'acquisto di animali da rimonta.

Per la diagnosi di paratubercolosi bovina sono disponibili diversi test. Considerando i costi e la rapidità della risposta, la soluzione più favorevole al momento è l'utilizzo del test ELISA, abbinato, se si vuole aumentare la sensibilità diagnostica, alle colture fecali.

Nella fase iniziale, allo scopo di accertare la presenza dell'infezione in allevamento, un campionamento significativo potrebbe essere rappresentato da almeno 30 capi a maggior rischio di esposizione come casi clinici sospetti, capi acquistati o comunque animali di età compatibile con la presenza di anticorpi contro Map. In fasi successive, una volta accertata la presenza di infezione, il controllo dovrebbe includere un test a tappeto su tutto l'allevamento o un prelievo programmato alla messa in asciutta. La frequenza dei test deve essere predefinita a la programmazione va riportata sul PGS; gli esami, su tutto l'effettivo devono essere eseguiti come minimo una volta l'anno.

### **Azione 5: Stesura del PGS**

In linea con le aspettative dell'allevatore, devono essere definiti obiettivi a breve e lungo termine, perseguibili e realistici, modificabili nel tempo e misurabili.

Le priorità degli interventi sono definite considerando la prevalenza dell'infezione, i risultati dell'analisi del rischio, gli obiettivi, le altre priorità gestionali o sanitarie e le risorse disponibili.

**Azione 6: Misure per ridurre il rischio di contaminazione del latte da parte di Map nelle aziende infette**

Questa azione è opzionale e può essere adottata nel caso in cui si vogliono fornire delle garanzie sul rischio di contaminazione da Map del latte, da parte di aziende infette da paratubercolosi.

La presenza di Map nel latte dipende da due fattori:

- prevalenza di infezione in allevamento, in particolare presenza di animali con elevata escrezione fecale di Map;
- contaminazione fecale del latte.

Per avere un basso rischio di contaminazione, l'allevamento deve raggiungere il livello di bassa prevalenza (soggetti positivi ai test 5%) ed eliminare tutti i soggetti forti eliminatori. Per tale motivo è necessario che tra i test eseguiti sia previsto anche l'esame colturale delle feci, applicando eventualmente la prova PCR a pool di feci.

Per evitare la contaminazione fecale del latte è necessario garantire un elevato livello di igiene della mammella.

Per verificare l'efficacia degli interventi adottati, occorre mettere in atto un controllo microbiologico su campioni di latte di massa mediante:

- esame batteriologico per la ricerca di Map (1–3 volte l'anno); esito atteso = assente;
- esame batteriologico per la ricerca di coliformi fecali (1–2 volte al mese); esito atteso < minore di 100 ufc/ml.

La frequenza degli esami dovrà essere predeterminata e inserita nel PGS.

**Azione 7: Verifica dell'attività svolta, dei risultati ed eventuale rimodulazione del PGS**

Qualsiasi modello gestionale deve poter essere monitorato, valutando se gli interventi programmati sono stati realizzati, se è dimostrata l'efficacia dell'intervento e se sono necessarie modifiche. Risulta quindi necessario stabilire una scadenza regolare per la verifica; verificare se gli interventi definiti nel PGS sono stati realizzati, valutare i motivi delle eventuali inadempienze e riprogrammare gli interventi per il futuro; valutare nel tempo se si evidenziano miglioramenti su: incidenza dei casi clinici all'anno, età dei soggetti più giovani con sintomatologia, andamento della percentuale di nuovi casi di positività ai test.

**Linee guida per il controllo della paratubercolosi negli allevamenti di bovine da latte**

Le linee guida prevedono azioni di biosicurezza nei diversi comparti aziendali presi in considerazione durante l'analisi del rischio e sono: la sala parto, la vitellaia, il reparto rimonta, il pascolo e altro. Per ulteriori dettagli si rimanda al sito del Centro di Referenza Nazionale per la paratubercolosi presso l'Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna sezione di Piacenza [86].

## 2.11 Presenza di Map nel latte e derivati

Numerosi studi hanno dimostrato che vacche affette da paratubercolosi eliminano Map con il latte (Florou, 2008 [87]; Grant, 2001 [88]) e che la quantità di batteri eliminata è in funzione dello stadio evolutivo della malattia (vedi tabella 4.3).

Stadio	Proporzione degli animali in ogni stadio	Eliminazione diretta di Map nel latte (Map/l)	Map in feci (Map/gr)	Map totale nel latte (Map/l)
Stadio I		0	0	0
Stadio II	0.8	0	0	0
	0.2	0	$10^2$	4
Stadio III	0.6	$10^2$	$10^2$	$1.04 \times 10^2$
	0.24	$10^2$	$10^4$	$5 \times 10^2$
	0.16	$10^2$	$10^7$	$4.001 \times 10^5$
Stadio IV		$10^4$	$10^9$	$4.001 \times 10^7$

Tabella 2.10: Concentrazione di Map nel latte individuale di vacche adulte nei diversi stadi della malattia (Map totale nel latte = eliminazione diretta+contaminazione fecale x Map in feci. La contaminazione fecale è assunta essere 0.04 g/l di latte). La concentrazione di Map nel latte di massa è approssimativamente uguale alla media della concentrazione di Map nel latte individuale di ogni vacca della mandria, da Weber, 2008 [89].

Tali dati sono stati ricavati sulla base di studi quantitativi volti a determinare la quota di Map presente nel latte dovuto ad eliminazione diretta attraverso il secreto della mammella (Ayele, 2005 [90]; Giese, 2000 [91]; Sweeney, 1992 [9]), per contaminazione fecale del latte (Standouders, 1990 [92]), tenendo conto anche dell'eliminazione di Map con le feci (Chiodini, 1984 [56]; Weber, 2008 [89]) e della concentrazione di Map nel latte di massa (Grant, 2002 [93]).

In uno studio condotto in Messico su 14 mandrie di bovine da latte e su 3 greggi di caprini risultate positive al test ELISA su siero, Map è stato rintracciato nel 100% dei campioni di latte di massa utilizzando la tecnica della PCR (Favila-Humara, 2010 [94]).

Come già anticipato, Map è in grado di sopravvivere al processo di pasteurizzazione del latte (Sung, 1998 [7]).

In uno studio su formaggi freschi ottenuti da latte crudo in Svizzera, il 4.2% dei campioni sono risultati positivi con la tecnica PCR dimostrando quindi il potenziale rischio di esposizione dell'uomo a Map attraverso l'ingestione di derivati del latte (Stephan, 2007 [95]).

Per la mancanza di dati quantitativi circa l'esposizione umana a Map, la concentrazione accettabile di micobatteri nel latte di massa non è ancora conosciuta. Alcune ricerche (Sung, 1998 [7]; Grant, 2005 [96]) hanno dimostrato che Map può sopravvivere al processo di pasteurizzazione HTST (High-Temperature Short-Time) quando la sua concentrazione iniziale è  $\geq 10^4$  batteri per litro di latte, quindi si può ritenere accettabile una concentrazione iniziale di Map inferiore a  $10^3$  per litro di latte crudo (Weber, 2008 [89]).

## 2.12 Problemi di Sanità Pubblica

Una grande varietà di specie animali, inclusi i primati non umani, possono infettarsi con Map, ciò fa supporre che anche l'uomo possa infettarsi. Map viene costantemente rilevato attraverso tecniche molecolari in pazienti umani affetti da una patologia epidemiologicamente e patogeneticamente simile alla malattia di Johne, denominata Morbo di Crohn (Abubakar, 2008 [97]; Feller, 2007 [98]).

Il morbo di Crohn è una malattia infiammatoria cronica del tratto gastrointestinale, è dolorosa e spesso debilitante e colpisce milioni di persone in tutto il mondo. Fattori genetici e ambientali sembrano essere coinvolti nell'eziologia della malattia insieme a disfunzioni immunitarie. La malattia sembra essere quindi multifattoriale.

L'associazione tra Map e il morbo di Crohn è molto controversa e dibattuta. Nel 1984 Chiodini [11] e collaboratori isolarono il batterio in pazienti malati di morbo di Crohn. Studi successivi dimostrarono che questi batteri inoculati in capre erano in grado di determinare la malattia di Johne (Florou, 2008 [87]). Da allora sono stati condotti numerosi studi con lo scopo di determinare la correlazione tra Map e Morbo di Crohn ma tutt'ora l'argomento è ancora fortemente dibattuto e non c'è accordo tra i diversi Autori. Riguardo al ruolo di Map nella patologia umana esistono due tesi: la prima che riconosce Map

come la principale causa di morbo di Crohn e la seconda che sostiene che il più alto numero di micobatteri presenti nei pazienti umani è causato da una sottostante disfunzione del sistema immunitario alla base della malattia (Tuci, 2011 [99]; Rosenfeld, 2010 [100]; Chiodini, 2012 [101]; Hermon-Taylor, 2000 [102]; Over, 2011 [103]).

Studi recenti hanno correlato Map al diabete di tipo I. Cossu e collaboratori hanno evidenziato la presenza di anticorpi contro due proteine specifiche di Map (MptD e MAP3738c) nel siero di pazienti affetti da diabete mellito di tipo I e II. La proteina MptD è stata riconosciuta come un fattore di virulenza di Map mentre MAP3738c ancora non è stata studiata. Entrambe le proteine sono codificate da geni appartenenti a una specifica isola di patogenicità di Map. Sono stati testati 43 sieri di pazienti affetti da diabete mellito di tipo I, 56 sieri di pazienti affetti da diabete mellito di tipo II e 48 sieri di soggetti sani con il test ELISA per valutare la risposta immunitaria contro proteine ricombinanti di MptD e MAP3738c. I risultati hanno mostrato una risposta positiva ad entrambe le proteine nei pazienti affetti da diabete mellito di tipo I, mentre non sono state trovate differenze tra i pazienti affetti da diabete mellito di tipo II e i soggetti sani. I risultati quindi suggeriscono una potenziale relazione tra pazienti affetti da diabete mellito di tipo I e l'infezione batterica (Cossu et alii, 2011 [104]).

Nell'Ottobre del 2011 è stato pubblicato un ulteriore articolo che prova una certa cross-reattività tra l'epitopo MAP3865c e l'antigene ZnT8 presente nelle cellule- $\beta$  del pancreas (Masala et alii, 2011 [105]).

Uno studio condotto dal Prof. Sechi dell'Università di Sassari su 50 pazienti sardi affetti da sclerosi multipla, ipotizza che attraverso un meccanismo di "mimetismo molecolare", alcuni antigeni di Map siano in grado di indurre una risposta autoimmune nei confronti di cellule del sistema nervoso. In particolare, come possibile causa scatenante la reazione autoimmune, è stata descritta la proteina MAP2964, una proteina transmembrana conservata nella famiglia delle *Mycobacteriaceae*, ma non esclusiva di Map (Cossu, 2011 [106]).

Contemporaneamente viene sottolineato come, in analogia a quanto già ipotizzato e pubblicato dagli stessi Autori per il diabete mellito di tipo I e per il morbo di Crohn, alla base della malattia ci sia una predisposizione legata a specifici polimorfismi di geni che codificano per alcune proteine del sistema immunitario, che appaiono particolarmente rappresentati nella popolazione sarda.

**Parte II**  
**Parte sperimentale**

## CAPITOLO 3

### SCOPO DELLA TESI

Lo scopo di questo studio è quello di contribuire all'aggiornamento delle informazioni sulla prevalenza della paratubercolosi nelle aziende di bovine da latte del centro Italia. In questa area territoriale del nostro Paese le informazioni sono disponibili con molte limitazioni; risulta invece più completo lo scenario riguardante le regioni settentrionali.

Nel corso di due anni è stata svolta un'attività di analisi di prevalenza mediante test ELISA su campioni di siero bovino raccolti nell'ambito delle attività istituzionali relative ai piani di eradicazione della brucellosi bovina nonché della Leucosi bovina enzootica afferenti al laboratorio di Sierologia della sezione di Firenze dell'Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle regioni Lazio e Toscana negli anni 2010–2012.

Successivamente è stata condotta un'indagine per valutare la presenza di Map nel latte tramite prova PCR negli allevamenti risultati positivi alle prove preliminari.

## CAPITOLO 4

# MATERIALI E METODI

In questo studio sono stati utilizzati i campioni di sangue pervenuti al laboratorio di sierologia dell'Istituto Zooprofilattico Sperimentale (sez. di Firenze) per i controlli ufficiali eseguiti dai veterinari delle ASL delle Provincie di Firenze, Pistoia e Prato. Successivamente dalle aziende risultate positive sono stati raccolti dei campioni di latte di massa che sono stati sottoposti alla prova della PCR per mettere in evidenza la presenza del Map. La prova è stata eseguita presso il Dipartimento di Patologia Animale, Profilassi e Igiene degli Alimenti della facoltà di Medicina Veterinaria dell'Università di Pisa.

### 4.1 Raccolta e preparazione campioni

I campioni pervenuti sono stati centrifugati per 3 minuti a 3500 rpm. Il siero così ottenuto è stato archiviato in piastre da 96 pozzetti di polietilene contenenti circa 800  $\mu$ l e congelati a -20 °C in attesa dell'esecuzione delle prove. Dai verbali di campionamento sono stati ricavati tutti i dati anagrafici dell'azienda e quelli relativi agli animali in modo da poter selezionare solo i soggetti con età superiore ai 36 mesi. La popolazione in esame è risultata essere composta da 578 animali provenienti da 25 aziende (vedi tabella 4.1).

Il kit impiegato è stato ID Screen<sup>®</sup> Paratuberculosis Indiretto (IDVET, Francia) e in seguito i campioni positivi sono stati confermati con il kit ID Screen<sup>®</sup> Paratuberculosis Indiretto test bicupola (IDVET, Francia). Dagli allevamenti confermati positivi è stato prelevato un campione di latte di massa seguendo i criteri illustrati dal manuale "Istruzioni operative per il campionamento del latte di massa in allevamento" [107]. Su tali campioni è

---

Età	Numero	Percentuale
3 anni	144	24,9%
4 anni	139	24%
5 anni	68	11,8%
6 anni	65	11,2%
7 anni	41	7,1%
8 anni	30	5,3%
≥9 anni	91	15,7%

---

Tabella 4.1: Distribuzione della popolazione secondo l'età.

stata eseguita la PCR in modo da poter mettere in evidenza la presenza del Map.

## 4.2 Test ELISA

### 4.2.1 Principi

La prova si basa su una tecnica ELISA indiretta che si sviluppa nelle seguenti fasi:

1. I sieri da esaminare vengono diluiti e preincubati in un tampone contenente un estratto di *M. phlei*, al fine di eliminare le possibili reazioni aspecifiche dovute prevalentemente alla presenza nel siero di anticorpi diretti contro i MOTT ambientali.
2. Dopo l'incubazione, i sieri vengono trasferiti in micropiastre di polistirene in cui i pozzetti sono stati adsorbiti con un antigene protoplasmatico di Map; se nel siero sono presenti anticorpi specifici verso Map essi si legano all'antigene adsorbito ai pozzetti formando degli immunocomplessi.
3. Dopo il lavaggio, viene aggiunto ai pozzetti un anticorpo monoclonale anti-IgG di ruminante, coniugato ad un enzima. Il coniugato si lega agli immunocomplessi eventualmente presenti.
4. Dopo il lavaggio, il substrato cromogeno dell'enzima (TMB) viene aggiunto al pozzetto; in presenza di immunocomplesso (reazione positiva)

si ha una colorazione blu del contenuto del pozzetto che diventa gialla dopo l'arresto della reazione. L'intensità del colore è direttamente correlata al livello di anticorpi presenti nel campione.

5. Il valore di assorbanza viene letto al lettore fotometrico ad una lunghezza d'onda di 450 nm. Il livello soglia (cut-off) viene stabilito mediante l'utilizzo di controlli (positivo e negativo) forniti dal kit, da aggiungere insieme ai campioni in ciascuna micropiastre.

### **4.2.2 Componenti del kit ELISA**

Il kit Elisa comprende i seguenti componenti:

- Micropiastre adese con estratto purificato di Map
- Coniugato concentrato (10x)
- Controllo positivo
- Controllo negativo
- Soluzione di diluizione 6
- Soluzione di diluizione per coniugato
- Soluzione di lavaggio concentrata (20x)
- Soluzione substrato (TMB)
- Soluzione di stoppaggio ( $H_2SO_4$ )

### **4.2.3 Apparecchiature, materiali e reagenti impiegati**

#### APPARECCHIATURE

Le apparecchiature necessarie per l'esecuzione delle prove sono:

- Centrifuga
- Agitatore per micropiastre
- Pipetta monocanale da 1 a 10  $\mu l$
- Pipetta monocanale da 10 a 200  $\mu l$
- Pipetta multicanale da 20 a 200  $\mu l$

- Pipettrici elettrica
- Lavatore automatico per micropiastre
- Lettore per micropiastre

#### MATERIALI

I materiali di consumo impiegati sono:

- Puntali monouso per pipette
- Micropiastre da 96 pozzetti
- Fogli autocollanti o coperchio per micropiastre
- Pipette graduate monouso sterili
- Vaschette di plastica in polipropilene

#### REAGENTI

I reagenti necessari vengono forniti direttamente dal kit con la sola esclusione di acqua distillata necessaria per diluire la soluzione di lavaggio.

### 4.2.4 Modalità Operativa

Prima dell'uso, tutti i reagenti devono essere portati a temperatura ambiente ( $21^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$ ) ed omogenizzati attraverso capovolgimento o tramite Vortex.

#### PRE-INCUBAZIONE DEI CAMPIONI

I campioni sono diluiti 1:12 procedendo come segue: in una micropietra di pre-diluzione da 96 pozzetti, distribuire:

- 10 o 20  $\mu\text{l}$  di controllo negativo nei pozzetti A1 e B1 rispettivamente per screening e confirmation
- 10 o 20  $\mu\text{l}$  di controllo positivo nei pozzetti C1 e D1 rispettivamente per screening e confirmation
- 10 o 20  $\mu\text{l}$  di ogni campione nei pozzetti rimanenti rispettivamente per screening e confirmation
- 110 o 220  $\mu\text{l}$  di soluzione di diluizione 6 in ogni pozzetto rispettivamente per screening e confirmation

Incubare tra 5 e 45 minuti a  $21^{\circ}\text{C}$  ( $\pm 5^{\circ}\text{C}$ ).

#### INCUBAZIONE DEI CAMPIONI

Nel caso della prova confirmation ogni campione deve essere distribuito in doppio.

Trasferire  $100\ \mu\text{l}$  di controlli e campione dopo neutralizzazione nei micropozzetti delle micropiastre ELISA adsorbite con antigene. Incubare 45 minuti ( $\pm 4\ \text{min}$ ) a  $21^{\circ}\text{C}$  ( $\pm 5^{\circ}\text{C}$ ).

#### LAVAGGIO

Lavare ogni pozzetto tre volte con circa  $300\ \mu\text{l}$  di soluzione di lavaggio, evitando di far asciugare i pozzetti tra i lavaggi.

#### INCUBAZIONE DEL CONIUGATO

Preparare il coniugato diluendo il coniugato concentrato 1:10 in soluzione di diluizione 3.

Distribuire  $100\ \mu\text{l}$  di coniugato diluito in ogni pozzetto. Incubare per 30 min ( $\pm 3\ \text{min}$ ) a  $21^{\circ}\text{C}$  ( $\pm 5^{\circ}\text{C}$ ).

#### LAVAGGIO

Lavare ogni pozzetto tre volte con circa  $300\ \mu\text{l}$  di soluzione di lavaggio, evitando di far asciugare i pozzetti tra i lavaggi.

#### RIVELAZIONE

Distribuire  $100\ \mu\text{l}$  di soluzione substrato in ogni pozzetto. Incubare 15 minuti ( $\pm 2\ \text{min}$ ) a  $21^{\circ}\text{C}$  ( $\pm 5^{\circ}\text{C}$ ) nell'oscurità. Distribuire  $100\ \mu\text{l}$  di soluzione di stoppaggio in ogni pozzetto in modo da fermare la reazione.

Leggere e registrare le densità ottiche a  $450\ \text{nm}$ .

## 4.2.5 Modalità di Calcolo

#### PROVA ELISA SCREENING

I risultati della prova ELISA sono considerati attendibili se si verificano le seguenti condizioni:

- Il valore medio di densità ottica netta dei controlli positivi ( $D.O.CP$ ) è superiore a 0,350;
- Il rapporto tra le medie della densità ottica netta dei controlli positivi ( $D.O.CP$ ) e dei controlli negativi ( $D.O.CN$ ) è superiore a 3.

Nel caso in cui i criteri di accettazione della prova non siano rispettati la prova deve essere ripetuta.

PROVA ELISA CONFIRMATION

L'esito delle prove è calcolato sul valore della  $D.O.NETTA$  di ogni campione, ottenuto dalla differenza tra il valore di assorbanza della colonna pari dei micropozzetti e quello della colonna dispari:

$$D.O.NETTA = D.O.PARI - D.O.DISPARI$$

I risultati della prova ELISA sono considerati attendibili se si verificano le seguenti condizioni:

- Il valore medio di densità ottica netta dei controlli positivi ( $D.O.CP$ ) è superiore a 0,350;
- Il rapporto tra le medie della densità ottica netta dei controlli positivi ( $D.O.CP$ ) dei controlli negativi ( $D.O.CN$ ) è superiore a 3,5.

Nel caso in cui i criteri di accettazione della prova non siano rispettati la prova deve essere ripetuta.

### 4.2.6 Criteri di Valutazione

PROVA ELISA SCREENING

Utilizzando il foglio di calcolo excel per ogni campione viene calcolato il valore del rapporto %S/P come il rapporto tra la differenza del valore di densità ottica del campione e del controllo negativo con la differenza tra il valore di densità ottica del campione positivo e del campione negativo, il risultato viene poi moltiplicato per cento.

$$\%S/P = ((D.O.CAMPIONI - D.O.CN)/(D.O.CP - D.O.CN)) 100$$

PROVA ELISA CONFIRMATION

Utilizzando il foglio di calcolo excel per ogni campione viene calcolato il valore del rapporto %S/P.

$$\%S/P = (D.O.NETTACAMP/D.O.NETTACP) 100$$

I criteri di valutazione per entrambe le prove sono:

- I campioni con un valore S/P minore o uguale 60% sono considerati negativi;

- I campioni con un valore S/P compreso tra maggiore di 60% e inferiore 70% sono considerati dubbi;
- I campioni con un valore S/P  $\geq$  maggiore o uguale 70% sono considerati positivi.

<b>Risultato</b>	<b>Status</b>
S/P% $\leq$ 60%	NEGATIVO
60%<S/P%<70%	DUBBIO
S/P% $\geq$ 70%	POSITIVO

Tabella 4.2: Criteri di valutazione del test ELISA, ID Screen<sup>®</sup> Paratuberculosis Indiretto test Bicupola (IDVET, Francia).

### 4.3 Prova PCR

Dalle aziende risultate positive alla prova ELISA sono stati raccolti campioni di latte di massa, che sono stati sottoposti alla prova della PCR presso il Dipartimento di Malattie Infettive della facoltà di Medicina Veterinaria dell'Università di Pisa.

#### ESTRAZIONE

I campioni di latte sono stati sottoposti ad estrazione del DNA, mediante DNeasy<sup>®</sup> Blood & Tissue (Quiagen, Germania).

Per ogni campione è stato eseguito il seguente protocollo:

1. centrifugare 10 ml di ogni campione a 3500g per 30 min e raccogliere 100  $\mu$ l di sedimento;
2. aggiungere 180  $\mu$ l di un primo tampone di lisi Buffer ATL;
3. aggiungere 20  $\mu$ l di Proteinase K, mescolare e incubare, per ottenere la lisi a bagnomaria a 56 C overnight;
4. mescolare con vortex per 15 sec; aggiungere 200  $\mu$ l del secondo tampone di lisi Buffer AL e aggiungere 200  $\mu$ l di etanolo (96–100%), mescolare per 15 sec;

5. trasferire il campione in una DNeasy spin column (DNsc) inserita in una provetta da 2 ml e centrifugare a 8000 rpm per 1 minuto;
6. porre la DNsc in una nuova provetta da 2 ml e aggiungere 500  $\mu$ l della prima soluzione di lavaggio (buffer AW1), contenente 56,8% di etanolo;
7. centrifugare a 8000 rpm per 1 minuto
8. trasferire la DNsc in una nuova provetta da 2 ml e aggiungere 500  $\mu$ l della seconda soluzione di lavaggio (Buffer AW2), contenente il 69,76% di etanolo;
9. centrifugare a 12000 rpm per 3 minuti;
10. porre la DNsc in una microprovetta da 1,5 ml e aggiungere 200  $\mu$ l della soluzione di eluizione (Buffer AE);
11. incubare a temperatura ambiente per 1 minuto e poi centrifugare a 8000 rpm per 1 minuto.

Il prodotto ottenuto che rappresenta l'eluato contenente DNA, viene conservato a 4°C e su di esso viene eseguita la PCR.

#### AMPLIFICAZIONE

I campioni di DNA estratti sono stati sottoposti a PCR utilizzando i primer IS900-1 e IS900-2 che permettono l'amplificazione di un tratto di 314 bp dell'insero IS900, presente soltanto in Map.

L'amplificazione è stata condotta, per ciascun campione, su un volume di reazione di 25  $\mu$ l, contenente 2  $\mu$ l di DNA e 23  $\mu$ l di master mix. Quest'ultimo a sua volta, è stato allestito secondo lo schema riportato in tabella 4.3.

La reazione è stata eseguita in termocicizzatore (Perkin Elmer, GeneAmp PCR System 2700) programmato a 50 cicli, ciascuno di 1 minuto a 95°C, 2 minuti a 65°C e 3 minuti a 72°C. Il primo ciclo è stato preceduto da una iniziale denaturazione a 95°C per 10 minuti, mentre l'ultimo ciclo è stato seguito da una estensione finale 72°C per 5 minuti.

I prodotti dell'amplificazione sono stati sottoposti a corsa elettroforetica su gel di agarosio al 15% in TAE (Tris-acido acetico glaciale-EDTA) a 100 V per 50 minuti.

Il gel è stato colorato con bromuro di etidio, osservato ai raggi UV e fotografato (Fig.4.1).

Reagente	Quantità
10x Qiagen PCR Buffer	2,5 $\mu$ l
Q solution	5 $\mu$ l
dNTP (desossinucleotidi trifosfato)	200 $\mu$ M
Primer IS900-1	0,5 $\mu$ M
Primer IS900-2	0,5 $\mu$ M
Taq (Qiagen)	1,25 U

Tabella 4.3: Reagenti necessari per l'esecuzione della prova PCR con kit DNeasy<sup>®</sup> Blood & Tissue (Quiagen, Germania).

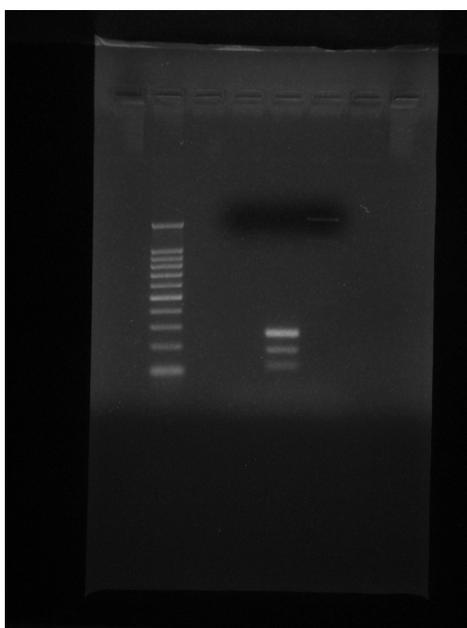


Figura 4.1: Lettura del gel dopo la corsa.

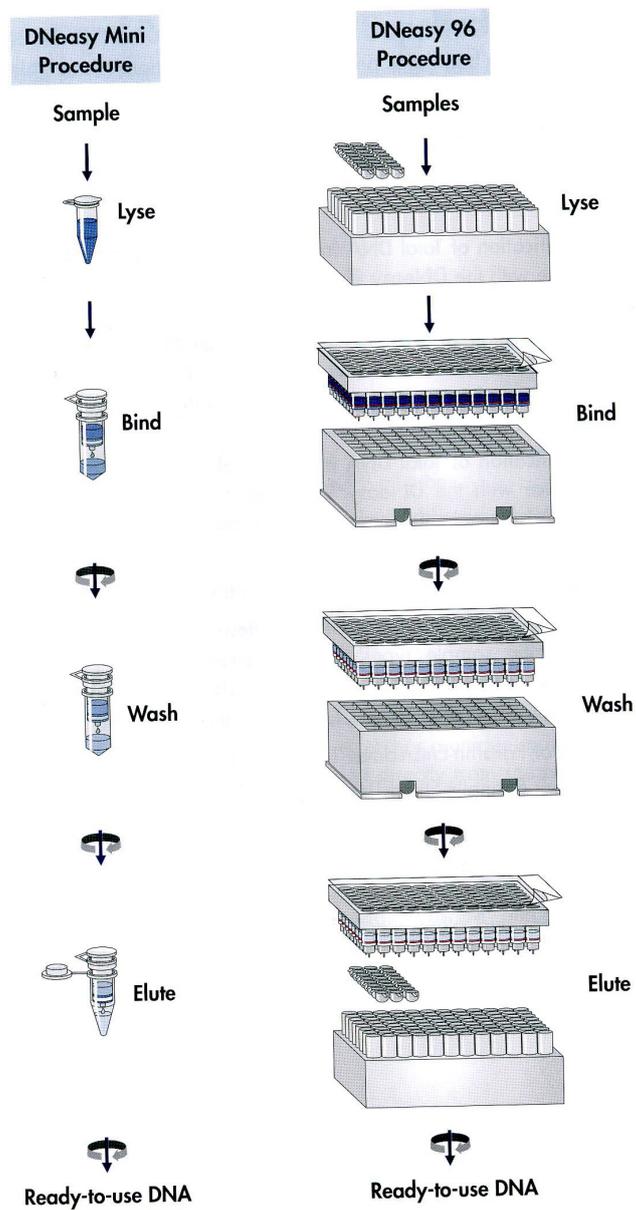


Figura 4.2: Procedura di estrazione del DNA mediante DNeasy<sup>®</sup> Blood & Tissue (Quiagen, Germania).

## CAPITOLO 5

## RISULTATI

Le attività di analisi svolte su campioni appartenenti ad allevamenti di bovine da latte del territorio in esame sono state impostate, là dove possibile, considerando le performance dei test sierologici disponibili sul mercato che normalmente hanno dei valori di sensibilità e specificità che si attestano al 40% e tra il 98,2% e il 99,5% rispettivamente (OIE Terrestrial Manual, 2008 [58] ). La numerosità campionaria è stata calcolata in base alla media dei soggetti presenti negli allevamenti appartenenti all'area territoriale del nord-est della Toscana, tenendo conto delle diverse realtà produttive esistenti tra le zone della provincia di Firenze. Questo ha comportato la scelta di una precisa numerosità campionaria di 30 soggetti per gli allevamenti con consistenza di almeno 100 capi prevalentemente collocati nell'area del Mugello, per le aziende di consistenza inferiore il campione utilizzato è stato il più possibile sovrapponibile a quello dell'intero effettivo.

Le aziende che risultavano presenti sul territorio oggetto di indagine all'inizio delle attività sperimentali nel Marzo 2010 erano 60. Il numero di aziende oggetto del campionamento è stato di 25, pari al 41,6% delle aziende censite. In tabella 5.2 sono riportati i dati ottenuti dall'analisi sierologiche condotte con metodo ELISA per le diverse aziende.

Dall'analisi dei dati anagrafici degli animali risultati positivi è stato possibile elaborare la tabella 5.1. Tutti gli allevamenti positivi ad esclusione di 3 non reperibili sono stati oggetto di un campionamento di latte di massa per l'esecuzione della prova di PCR e 1 campione su 10 analizzati è risultato positivo.

Età	Positivi/Campionati	%
3 anni	10/144	6,94%
4 anni	8/139	5,75%
5 anni	9/68	13,23%
6 anni	4/65	6,15%
7 anni	1/41	2,43%
8 anni	0/30	0,0%
≥9 anni	4/91	4,39%

Tabella 5.1: Distribuzione della popolazione positiva secondo l'età.

Nome Azienda	Azienda Campionata	Azienda Positiva	% Aziende Positive	Animali campionati	Animali positivi	Consistenza aziendale	Rapporto pos/camp	Latte	Misto
PT 1	1	1		8	1	10	12,50%	0	1
PT 2	1	1		30	2	37	6,67%	0	1
PT 3	1	0		19	0	23	0,00%	1	0
PT 4	1	0		6	0	9	0,00%	0	1
PT 5	1	0		10	0	14	0,00%	0	1
PT 6	1	1		30	4	80	13,33%	1	0
<b>TOT PT</b>	<b>6</b>	<b>3</b>	<b>50,00%</b>	<b>103</b>	<b>7</b>	<b>173</b>	<b>6,80%</b>	<b>2</b>	<b>4</b>
FI MUG 1	1	1		18	3	24	16,67%	1	0
FI MUG 2	1	1		30	2	196	6,67%	1	0
FI MUG 3	1	0		30	0	42	0,00%	1	0
FI MUG 4	1	1		30	2	41	6,67%	1	0
FI MUG 5	1	0		30	0	36	0,00%	1	0
FI MUG 6	1	1		30	3	131	10,00%	1	0
FI MUG 7	1	0		21	0	25	0,00%	1	0
FI MUG 8	1	1		30	2	71	6,67%	1	0
FI MUG 9	1	1		30	5	328	16,67%	1	0
FI MUG 10	1	1		30	3	149	10,00%	1	0
FI MUG 11	1	0		30	0	118	0,00%	1	0
FI MUG 12	1	0		30	0	117	0,00%	1	0
FI MUG 13	1	0		10	0	13	0,00%	1	0
FI MUG 14	1	1		30	3	675	10,00%	1	0
<b>TOT FI MUG</b>	<b>14</b>	<b>8</b>	<b>57,14%</b>	<b>379</b>	<b>23</b>	<b>1966</b>	<b>6,07%</b>	<b>14</b>	<b>4</b>
EMP 1	1	1		18	2	21	11,11%	1	0
EMP 2	1	0		5	0	8	0,00%	1	0
<b>TOT EMP</b>	<b>2</b>	<b>1</b>	<b>50,00%</b>	<b>23</b>	<b>2</b>	<b>29</b>	<b>8,70%</b>	<b>2</b>	<b>0</b>
<b>TOT FI N-O</b>	<b>1</b>	<b>0</b>	<b>0,00%</b>	<b>13</b>	<b>0</b>	<b>16</b>	<b>0,00%</b>	<b>1</b>	<b>0</b>
PO 1	1	1		30	4	44	13,33%	0	1
PO 2	1	0		30	0	54	0,00%	1	0
<b>TOT PO</b>	<b>2</b>	<b>1</b>	<b>50,00%</b>	<b>60</b>	<b>4</b>	<b>98</b>	<b>6,67%</b>	<b>1</b>	<b>1</b>
<b>TOTALE</b>	<b>25</b>	<b>13</b>	<b>52,00%</b>	<b>578</b>	<b>36</b>	<b>2282</b>	<b>6,23%</b>	<b>20</b>	<b>5</b>

Tabella 5.2: Risultati delle prevalenze aziendale e intraaziendale ottenute dall'analisi sierologica mediante prova ELISA.

## CAPITOLO 6

### DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

Dagli esiti delle analisi riportati nel precedente capitolo si evince che nel territorio oggetto di indagine la paratubercolosi bovina è presente.

La prevalenza delle aziende che allevano bovine da latte risultate positive al test ELISA è risultata del 52%. La prevalenza apparente dei soggetti risultati positivi all'interno di ogni azienda è risultata in media del 6,38%. Tenendo conto della sensibilità e specificità del test utilizzato possiamo calcolare, attraverso la formula di Rogan-Gladen, che la prevalenza reale risulta essere dell'13,41%.

Analizzando l'età degli animali (vedi tabella 5.1) è possibile stratificare i dati di prevalenza all'interno delle fasce di età. Questo mette in evidenza che nella categoria dei 5 anni d'età è presente il maggior numero di capi positivi in rapporto al numero di animali campionati della stessa età (13,23%) mentre si evidenzia una graduale riduzione nelle categorie più anziane.

Questo dato in apparente contraddizione con la patogenesi della malattia, può essere spiegato ipotizzando che gli animali che manifestano sintomi (anche aspecifici) e quindi meno produttivi vengano riformati più precocemente. È necessario considerare anche le aziende in assenza di adeguate verifiche, peraltro difficili da definire in assenza di un piano nazionale di controllo, potrebbero, durante la compravendita, introdurre soggetti infetti.

Il campione di aziende analizzate nel complesso non è ancora sufficiente per poter traslare il risultato ottenuto all'intera popolazione del territorio oggetto di analisi. A questo scopo sono infatti in corso attività di indagine presso le sedi delle Sezioni diagnostiche territoriali dell'Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle regioni Lazio e Toscana nell'ambito di un progetto di ricerca ministeriale denominato "Indagine sulla paratubercolosi ovina e caprina nel

Lazio e nella Toscana: prevalenza e aspetti genetici”.

Dall’analisi dei dati emersi nel corso delle indagini condotte sul latte di massa non si può escludere il potenziale rischio igienico-sanitario legato al consumo dei prodotti lattiero caseari e pertanto il tema della paratubercolosi bovina diventa rilevante anche sotto l’aspetto della sicurezza alimentare. I campioni di latte di alcune aziende risultano infatti positivi, la vendita del latte crudo bovino è consentita anche all’interno dell’azienda con distributori automatici inoltre l’utilizzo di latte crudo bovino non si può escludere nella fabbricazione di alcuni prodotti lattiero-caseari locali. A questo proposito è necessario fare alcune considerazioni che chiariscono il motivo per cui di tutte le aziende positive ai controlli sierologici (n=13) e testate con metodo PCR utilizzando latte di massa solo una è risultata positiva. Non tutti gli animali positivi al test ELISA infatti eliminano Map con il latte, evento che si verifica nelle fasi più avanzate della malattia e pertanto non si possono escludere risultati positivo per la presenza di Map a controlli successivi.

La contaminazione esogena, che rappresenta l’altra via di contaminazione del latte, può essere contenuta dalla corretta gestione della sala mungitura e dal rispetto delle regole di igiene della mammella. Infine l’effetto diluizione legato alla raccolta del latte nel *tank* unito alle caratteristiche di sensibilità del metodo PCR (che permette di rilevare come positivi campioni di latte contenenti 10–100 UFC/mL) rende questa tipologia di prova maggiormente adeguata alla diagnosi individuale più che a quella di mandria.

Nel caso particolare possiamo affermare che l’azienda positiva non possedeva una sala mungitura e il carrello veniva utilizzato direttamente in stalla.

I metodi molecolari risultano quindi un fondamentale strumento di tutela delle produzioni zootecniche, infatti anche la proposta del piano nazionale di controllo e certificazione nei confronti della paratubercolosi bovina ne prevede l’utilizzo nella determinazione del “caso clinico”. È necessario ricordare che il metodo colturale, che tutt’oggi è utilizzato per le sue caratteristiche di sensibilità e specificità, richiede tempi di incubazione di molte settimane.

Ogni tipologia di analisi adeguatamente utilizzata risulterà uno strumento fondamentale sia della tutela della salute animale che dei prodotti nazionali. L’esportazione verso taluni Paesi terzi (Cina, India) di prodotti lattiero caseari richiede infatti già oggi garanzie riguardo l’assenza di casi clinici nelle aziende di provenienza del latte utilizzato nel processo di trasformazione.

## BIBLIOGRAFIA

- [1] Stockman SS. *Johne's disease in sheep*. Journal of Comparative Pathology, 1911.
- [2] Bergey DH and Holt JG. *Bergey's manual of Determinative bacteriology*. Baltimore : Williams & Wilkins, 1994.
- [3] Scatozza F and Farina R. *Trattato di Malattie infettive degli animali*. UTET, 1998.
- [4] Fondazione iniziative zooprofilattiche e zootecniche, Brescia. *Micobatteri atipici patogeni del futuro?* Zavanella M.,2012.
- [5] Thorel MF, Krichevsky M, and Lvy-Frbault VV. Numerical taxonomy of mycobactin-dependent mycobacteria, emended description of *Mycobacterium avium*, and description of *Mycobacterium avium* subsp. *avium* subsp. nov., *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* subsp. nov., and *Mycobacterium avium* subsp. *silvaticum* subsp. nov. *Int J Syst Bacteriol*, 40, pages 254–260, 1990.
- [6] Schulze-Rbbecke R and Buchholtz K. Heat susceptibility of aquatic mycobacteria. *Appl Environ Microbiol*, 58, pages 1869–73, 1992.
- [7] Sung N and Collins MT. Thermal tolerance of *Mycobacterium paratuberculosis*. *Appl Environ Microbiol*, 64, pages 999–1005, 1998.
- [8] Streeter RN, Hoffsis GF, Bech-Nielsen, Shulaw WP, and Rings DM. Isolation of *Mycobacterium paratuberculosis* from colostrum and milk of subclinically infected cows. *Am J Vet Res*, 56, pages 1322–4, 1995.

- [9] Sweeney RW, Whitlock RH, and Rosenberger AE. *Mycobacterium paratuberculosis* cultured from milk and supramammary lymph nodes of infected a symptomatic cows. *J Clin Microbiol*, 30, pages 166–71, 1992.
- [10] Taylor TK, Wilks CR, and McQueen DS. Isolation of *Mycobacterium paratuberculosis* from the milk of a cow with Johne's disease. *Vet Rec*, 109, pages 532–3, 1981.
- [11] Chiodini SR and Hermon TJ. The thermal resistance of *Mycobacterium paratuberculosis* in raw milk under conditions simulating pasteurization. *J Vet Diagn Invest*, 5, pages 629–631, 1993.
- [12] Grand IR, Ball HJ, Neill SD, and Rowe MT. Inactivation of *Mycobacterium paratuberculosis* in cows' milk at pasteurization temperatures. *Appl Environ Microbiol*, 62, pages 631–636, 1996.
- [13] Keswani J and Frank JF. Thermal inactivation of *Mycobacterium paratuberculosis* in milk. *J Food Prot*, 61, pages 974–978, 1998.
- [14] Stabel JR, Steadham EM, and Bolin CA. Heat inactivation of *Mycobacterium paratuberculosis* in raw milk: are current pasteurization conditions effective? *Appl Environ Microbiol*, 63, pages 4975–7, 1997.
- [15] Schroen C, Kluver P, McDonald W, Butler K, Condron R, and Hope A. Survival of *M. paratuberculosis* in the environment. *Report to Meat and Livestock Australia*, 2000.
- [16] Lovell R, Levi M, and Francis J. Studies on the survival of Johne's bacilli. *J comp Pathol*, 54, pages 120–129, 1944.
- [17] Larsen AB, Merkal RS, and Vardam TH. Survival time of *Mycobacterium paratuberculosis*. *Am J Vet Res*, 60, pages 549–551, 1956.
- [18] Johnson-Ifeorunlu YJ and Kaneene JB. Relationship between soil type and *Mycobacterium paratuberculosis*. *J Am Vet Med Assoc*, 210, pages 1735–40, 1997.
- [19] Johnson-Ifeorunlu YJ and Kaneene JB. Management-related risk factors for *M. paratuberculosis* infection in Michigan, USA, dairy herds. *rev Vet Med*, 37, pages 41–54, 1998.

- [20] Johnson-Ifeorunlu YJ and Kaneene JB. Distribution and environmental risk factors for paratuberculosis in dairy cattle herds in Michigan. *Am J Vet Res*, 60, pages 589–96, 1999.
- [21] von Reyn CF, Masloww JN, Barber TW, Falkinham JO, and Arbeit RD. Persistent colonization of potable water as a source of *Mycobacterium avium* infection in AIDS. *Lancet*, 343, pages 1137–41, 1994.
- [22] Iivanainen EK, Martikainen PJ, Vninen PK, and Katila ML. Environmental factors affecting the occurrence of mycobacteria in brook waters. *Appl Environ Microbiol*, 59, pages 398–404, 1993.
- [23] Kirschner RA Jr, Parker BC, and Falkinham JO 3rd. Epidemiology of infection by nontuberculous mycobacteria. *Mycobacterium avium*, *Mycobacterium intracellulare*, and *Mycobacterium scrofulaceum* in acid, brown-water swamps of the southeastern United States and their association with environmental variables. *Am Rev Respir Dis*, 145, pages 271–275, 1992.
- [24] Papapetropoulou M, Tsintzou A, and Vantarakis A. Environmental mycobacteria in bottled table waters in Greece. *Can J Microbiol*, 43, pages 499–502, 1997.
- [25] Taylor RH, Falkinham JO 3rd, Norton CD, and LeChevallier MW. Chlorine, chloramine, chlorine dioxide, and ozone susceptibility of *Mycobacterium avium*. *Appl Environ Microbiol*, 66, pages 1702–5, 2000.
- [26] Grand IR, Rowe MT, and Whan L. Interaction between *Mycobacterium avium* subsp. *Paratuberculosis* and environmental protozoa. *BMC Microbio*, 13, pages 6–63, 2006.
- [27] Collins DM, Gabric DM, and de Lisle GW. Identification of two groups of *Mycobacterium paratuberculosis* strains by restriction endonuclease analysis and DNA hybridization. *J Clin Microbiol*, 2, pages 1591–6, 1990.
- [28] Collins DM, Hilbink F, West DM, Hosie BD, Cooke MM, and de Lisle GW. Investigation of *Mycobacterium paratuberculosis* in sheep by faecal culture, DNA characterisation and the polymerase chain reaction. *Vet Rec*, 2, pages 599–600, 1993.

- [29] De Lisle GW, Collins DM, and Huchzermeyer HF. Characterization of ovine strains of *Mycobacterium paratuberculosis* by restriction endonuclease analysis and DNA hybridization. *Onderstepoort J Vet Res*, 59, pages 163–5, 1992.
- [30] Lombard JE. Epidemiology and economics of paratuberculosis. *Vet Clin North Am Food Anim Pract*, 27, pages 525–35, 2011.
- [31] Ferroglio E, Nebbia P, Robino P, Rosssi L, and Rosati S. *Mycobacterium paratuberculosis* infection in two free-ranging Alpine ibex. *Rev sci tech Off int Epiz*, 19, pages 859–862, 2000.
- [32] Stehman MS. Paratuberculosis in small ruminants, deer and south american camelids. *Vet Clin North Am Food Anim Pract*, 12, pages 441–455, 1996.
- [33] Judge J, Kyriazakis I, and Grig A et alii. Clustering of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in rabbit and the environment: how hot is a hot spot? *Appl Environ Microbiol*, 71, pages 6033–8, 2005.
- [34] Boadella M, Lyashchenko K, Greenwald R, Esfandiari J, Jaroso R, Carta T, Garrido JM, Vicente J, de la Fuente J, and Gortázar C. Serologic tests for detecting antibodies against *Mycobacterium bovis* and *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* in Eurasian wild boar (*Sus scrofa scrofa*). *J Vet Diagn Invest*, 23, pages 77–83, 2011.
- [35] Khol JL, Kralik P, Slana I, Beran V, Aurich C, Baumgartner W, and Pavlik I. Consecutive excretion of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* in semen of a breeding bull compared to the distribution in feces, tissue and blood by IS900 and F57 quantitative real time PCR and culture examinations. *J Vet Med Sci*, 72, pages 1283–1288, 2010.
- [36] Rischio di trasmissione del *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* tramite lo sperma di animali della specie bovina. *The EFSA Journal*, pages 1–59,110, 2004.
- [37] Sweeney RW. Transmission of paratuberculosis. *Vet Clin North Am Food Anim Pract*, 12, pages 305–12, 1996.
- [38] Sweeney RW, Whitlock RH, and Rosenberger AE. *Mycobacterium paratuberculosis* isolated from fetuses of infected cows not manifesting signs of the disease. *Am J Vet Res*, 53, pages 477–80, 1992.

- [39] Larsen AB, Stalheim OH, Hughes DE, Appell LH, Richards WD, and Himes EM. *Mycobacterium paratuberculosis* in the semen and genital organs of a semen-donor bull. *J Am Vet Med Assoc*, 179, pages 169–71, 1981.
- [40] Rohde RF and Shulaw WP. Isolation of *Mycobacterium paratuberculosis* from the uterine flush fluids of cows with clinical paratuberculosis. *J Am Vet Med Assoc*, 197, pages 1482–3, 1990.
- [41] Momotani E, Whipple DL, Thiermann AB, and Cheville NF. Role of M cells and macrophages in the entrance of *Mycobacterium paratuberculosis* into domes of ileal Peyer's patches in calves. *Vet Pathol.*, 25, pages 131–7, 1988.
- [42] Chiodini RJ. Immunology resistance to paratuberculosis. *Vet Clin North Am Food Anim Pract*, 12, pages 313–343, 1996.
- [43] Stabel JR. Transitions in immune responses to *Mycobacterium paratuberculosis*. *Vet Microbiol*, 77, pages 465–473, 2000.
- [44] Nielsen SS and Toft n. Age-specific characteristics of ELISA and fecal culture for purpose specific testing for paratuberculosis. *J Dairy Sci*, 89, pages 569–579, 2006.
- [45] Lepper AWD, Wilks CR, Kotiw M, Whitehead JT, and Swart KS. Sequential bacteriologic observations in relation to cell-mediated and humoral antibody responses of cattle infected with *Mycobacterium paratuberculosis* and maintained on normal or high iron intake. *Aust Vet J*, 66, pages 50–55, 1989.
- [46] Nielsen SS and Ersbøll AK. Age at occurrence of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in naturally infected dairy cows. *J Dairy Sci*, 89, pages 4557–4566, 2006.
- [47] Merkal RS, Kopecky KE, and Larsen AB. Immunologic mechanisms in bovine paratuberculosis. *Am J Vet Res*, 31, pages 475–85, 1970.
- [48] Whitlock RH. *Diarrhea in cattle in Veterinary Gastroenterology*. Lea & Febinger, Philadelphia, 1992.
- [49] Gilmour NJ, Nisbet DI, and Brotherston JG. Experimental oral infection of calves with *Mycobacterium johnei*. *J Comp Pathol*, 62, pages 281–6, 1965.

- [50] Patterson DS, Allen WM, Berrett S, Ivins LN, and Sweasey D. Some biochemical aspects of clinical Johne's disease in cattle. *Res Vet Sci*, 9, pages 117–29, 1968.
- [51] Rice CE and Carrière J. Studies of changes in serum proteins in cows and calves in a herd affected with Johne's disease. *Res Vet Sci*, 10, pages 188–96, 1969.
- [52] Szilagyi M, Krmendy B, Suri A, Tuboly S, and Nagy G. Experimental paratuberculosis (Johne's disease) – studies on biochemical parameters in cattle. *Arch Exp Veterinarmed*, 43, pages 463–70, 1989.
- [53] Patterson DS, Allen WM, and Berrett S. Plasma enzymes in clinical Johne's disease. *Vet Rec*, 77, pages 1287–9, 1965.
- [54] Kopecky KE, Larsen AB, and Merkal RS. Uterine infection in bovine paratuberculosis. *Am J Vet Res*, 28, pages 1043–5, 1967.
- [55] Sweeney RW, Whitlock RH, and Rosenberger AE. *Mycobacterium paratuberculosis* isolated from fetuses of infected cows not manifesting signs of the disease. *Am J Vet Res*, 53, pages 477–80, 1992.
- [56] Chiodini RJ, Van Kruiningen HJ, and Merkal RS. Ruminant paratuberculosis (Johne's disease): the current status and future prospects. *Cornell Vet*, 74, pages 218–62, 1984.
- [57] Larsen AB, Moyle AI, and Himes EM. Experimental vaccination of cattle against paratuberculosis (Johne's disease) with killed bacterial vaccines: a controlled field study. *Am J Vet Res*, 39, pages 65–9, 1978.
- [58] OIE. *OIE Terrestrial Manual 2008*. Pages 277–291.
- [59] Whitlock RH, Wells SJ, Sweeney RW, and Tiem J Van. ELISA and fecal culture for paratuberculosis (Johne's disease): sensitivity and specificity of each method. *Vet Microbiol*, 77, pages 387–398, 2000.
- [60] McFadden JJ, Butcher PD, Chiodini R, and Hermon-Taylor J. Crohn's disease–isolated mycobacteria are identical to *Mycobacterium paratuberculosis*, as determined by DNA probes that distinguish between mycobacterial species. *J Clin. Microbiol*, 25, pages 796–801, 1987.
- [61] McFadden JJ, Butcher PD, Chiodini R, Hermon-Taylor J, and Thompson J. The use of DNA probes identifying restriction fragment length polymorphisms to examine the *Mycobacterium avium* complex. *Mol Microbiol*, 1, pages 283–291, 1987.

- [62] Stabel JR and Bannantine JP. Development of a nested PCR method targeting a unique multicopy element, ISMap02, for detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in fecal samples. *J Clin Microbiol*, 43, pages 4744–4750, 2005.
- [63] Strommenger B, Stevenson K, and Gerlach GF. Isolation and diagnostic potential of ISMav2, a novel insertion sequence-like element from *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis*. *FEMS Microbiol Lett*, 196, pages 31–7, 2001.
- [64] Vansnick E, De Rijk P, Vercammen F, Geysen D, Rigouts L, and Portaels F. Newly developed primers for the detection of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis*. *Vet Microbiol*, 100, pages 197–204, 2004.
- [65] Vary PH, Andersen PR, Green E, Hermon-Taylor J, and McFadden JJ. Use of highly specific DNA probes and the polymerase chain reaction to detect *Mycobacterium paratuberculosis* in Johne's disease. *J Clin Microbiol*, 28, pages 933–7, 1990.
- [66] Jubb TF, Sergeant ES, Callinan AP, and Galvin J. Estimate of the sensitivity of an ELISA used to detect Johne's disease in Victorian dairy cattle herds. *Aust Vet J*, 82, pages 569–573, 2004.
- [67] Sergeant ES, Marshall DJ, Eamens GJ, Kearns C, and Whittington RJ. Evaluation of an absorbed ELISA and an agar-gel immuno-diffusion test for ovine paratuberculosis in sheep in Australia. *Prev Vet Med*, 61, pages 235–248, 2003.
- [68] Hope AF, Kluver PF, Jones SL, and Condron RJ. Sensitivity and specificity of two serological tests for the detection of ovine paratuberculosis. *Aust Vet J*, 78, pages 850–856, 2000.
- [69] Sherman DM, Markham RJ, and Bates F. Agar gel immunodiffusion test for diagnosis of clinical paratuberculosis in cattle. *J Am Vet Med Assoc*, 185, pages 179–182, 1984.
- [70] Gwozdz JM, Thompson KG, Murray A, Reichel MP, Manktelow BW, and West DM. Comparison of three serological tests and an interferon-gamma assay for the diagnosis of paratuberculosis in experimentally infected sheep. *Aust Vet J*, 78, pages 779–83, 2000.
- [71] Nielsen SS and Toft N. A review of prevalence of paratuberculosis in farmed animals in Europe. *Prev Vet Med*, 88, pages 1–14, 2009.

- [72] Pozzato N, Capello K, Comin A, Toft N, Nielsen SS, Vincenzoni G, and Arrigoni N. Prevalence of paratuberculosis infection in dairy cattle in Northern Italy. *Prev Vet Med*, 102, pages 83–86, 2011.
- [73] Benedictus G, Dijkhuizen AA, and Stelwagen J. Economic losses due to paratuberculosis in dairy cattle. *Vet Rec.*, 15, pages 142–6, 1987.
- [74] Lombard JE, Garry FB, McCluskey BJ, and Wagner BA. Risk of removal and effects on milk production associated with paratuberculosis status in dairy cows. *J Am Vet Med Assoc.*, 15, pages 1975–81, 2005.
- [75] Lombard JE. Epidemiology and economics of paratuberculosis. *Vet Clin North Am Food Anim Pract.*, 3, pages 525–35, 2011.
- [76] Ott SL, Wells SJ, and Wagner BA. Herd-level economic losses associated with johnes disease on US dairy operations,. *Prev Ve. Med*, 40, pages 179–192, 1999.
- [77] Dufour B, Pouillot R, and Durand B. A cost/benefit study of paratuberculosis certification in french cattle herds. *Vet Res*, 35, pages 69–81, 2004.
- [78] Assolatte. *Dati Export 2010*. [http://www.assolatte.it/assolatte/economia\\_subcat.jsp?subcat\\_id=11&cat\\_id=1](http://www.assolatte.it/assolatte/economia_subcat.jsp?subcat_id=11&cat_id=1).
- [79] Vallee H and Rinjard P. Etudes sur l'enterite paratuberculeuse des bovines. *Revue Generale Medicine Veterinaire*, 35, pages 1–9, 1926.
- [80] Harris NB and Barletta RG. *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in veterinary medicine. *Clin Microbiol Rev*, 14, pages 489–512, 2001.
- [81] Patton EA. Paratuberculosis vaccination. *Vet Clin North Am Food Anim Pract*, 27(3), pages 573–80, 2011.
- [82] van Schaik G, Stehman SM, and Schukken YH. Pooled fecal culture sampling for *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* at different herd sizes and prevalence. *J Vet Diagn Invest*, 15, pages 233–41, 2003.
- [83] Reddacliff L, Eppleston J, and Windsor P. Efficacy of a killed vaccine for the control of paratuberculosis in Australian sheep flocks. *Vet Microbiol*, 11, pages 577–90, 2006.

- [84] Juste R, Alonso-Hearn M, and Molina E. Significant reduction in bacterial shedding and improvement in milk production in dairy farms after the use of a new inactivated paratuberculosis vaccine in a field trial. *BMC Res Notes* 2009;2(1), page 233.
- [85] IZSLER - sez. Piacenza. *Programma volontario di certificazione per la paratubercolosi bovina (PVCPB) in provincia di Lodi*. [http://www.izsler.it/izs\\_bs/ftp//doc/CREF\\_paratubercolosi/compiti/Piano\\_cert\\_Lodi\\_deliberato.pdf](http://www.izsler.it/izs_bs/ftp//doc/CREF_paratubercolosi/compiti/Piano_cert_Lodi_deliberato.pdf).
- [86] IZSLER - sez. Piacenza. *Manuale per il controllo della Paratubercolosi negli allevamenti di bovine da latte*. [http://www.izsler.it/pls/izs\\_bs/v3\\_s2ew\\_CONSULTAZIONE.mostra\\_pagina?id\\_pagina=507](http://www.izsler.it/pls/izs_bs/v3_s2ew_CONSULTAZIONE.mostra_pagina?id_pagina=507).
- [87] Florou M, Leontides L, Kostoulas P, Billinis C, Sofia M, and Kyriazakis I. Isolation of *Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis* from non-ruminant wildlife living in the sheds and on the pastures of greek sheep and goats. *Epidemiol Infect*, 136, pages 644–652, 2008.
- [88] Grand IR, Rowe MT, Dundee L, and Hitchings E. *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis*: its incidence, heat resistance and detection in milk and dairy products. *Int J Dairy Tech*, 54, pages 2–13, 2001.
- [89] Weber MF, Nielen M, Velthuis AGJ, and van Roermund HJW. Milk quality assurance for paratuberculosis: simulation of within-herd infection dynamics and economics. *Vet Res*, 39, page 12, 2008.
- [90] Ayele WY, Svastova P, Roubal P, and Bartos M Pavlik I. *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* cultured from locally and commercially pasteurized cow's milk in the Czech Republic. *Appl Environ Microbiol*, 71, pages 1210–1214, 2005.
- [91] Giese SB and Ahrens P. Detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in milk from clinically affected cows by PCR and culture. *Vet Microbiol*, 77, pages 291–297, 2000.
- [92] Stadhouders J and Jørgensen K. Prevention of the contamination of raw milk by a hygienic milk production. *International Dairy Federation, Bulletin IDF 251*, pages 32–36, 1990.
- [93] Grand IR, Ball HJ, and Rowe MT. Incidence of *Mycobacterium paratuberculosis* in bulk raw milk and commercially pasteurized cow's milk

- from approved dairy processing establishments in the United Kingdom. *Appl Environ Microbiol* , 68, pages 2428–35, 2002.
- [94] Favila-Humara LC, Chávez-Gris GG, Carrillo-Casas EM, and Hernández-Castro R. *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* detection in individual and bulk tank milk samples from bovine herds and caprine flocks . *Foodborne Pathog Dis*, 4, pages 351–5, 2010.
- [95] Stephan R, Schumacher S, Tasara T, and Grant IR. Prevalence of mycobacterium avium subspecies paratuberculosis in swiss raw milk cheeses collected at the retail level. *J Dairy Sci*, 90, pages 3590–5, 2007.
- [96] Grand IR, Williams AG, Rowe MT, and Muir DD. Efficacy of various pasteurization time–temperature conditions in combination with homogenization on inactivation of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in milk. *Appl Environ Microbiol* , 71, pages 2853–2861, 2005.
- [97] Abubakar I, Myhill D, and Aliyu SH. Detection of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* from patients with Crohn’s disease using nucleic acid-based techniques: a systematic review and meta-analysis. *Inflamm Bowel Dis*, 14, pages 401–10, 2008.
- [98] Feller M, Huwiler K, and Stephan R. *Mycobacterium paratuberculosis* subspecies paratuberculosis and Crohn’s disease: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Infect Dis*, 9, pages 607–13, 2007.
- [99] Tuci A, Tono F, Castellani L, Sartini A, and alii. Fecal detection of *Mycobacterium avium paratuberculosis* using the IS900 DNA sequence in Crohn’s disease and ulcerative colitis patients and healthy subjects. *Dig Dis Sci*, 56, pages 2957–62, 2011.
- [100] Rosenfeld G and Bressler B. *Mycobacterium avium paratuberculosis* and the etiology of Crohn’s disease: a review of the controversy from the clinician’s perspective. *Can J Gastroenterol*, 24, pages 619–24, 2010.
- [101] Chiodini RJ, Chamberlin WM, Sarosiek J, and McCallum RW. Crohn’s disease and the mycobacterioses: a quarter century later. Causation or simple association? *Crit rev Microbiol*, 38, pages 52–93, 2012.

- [102] Hermon-Taylor J, Bull TJ, Sheridan JM, Cheng J, Stellakis ML, and Sumar N. Causation of Crohn's disease by *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. *Can J Gastroenterol*, 14, pages 521–39, 2000.
- [103] Over K, Crandall PG, O'Bryan CA, and Ricke SC. Current perspectives on *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*, Johne's disease and Crohn's disease: a review. *Crit Rev Microbiol*, 37, pages 141–56, 2011.
- [104] Cossu A, Rosu V, Paccagnini D, Pacifico A, and Sechi LA. MAP3738c and MptD are specific tags of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* infection in type I diabetes mellitus. *Clin Immunol*, 141, pages 49–57, 2011.
- [105] Masala S, Paccagnini D, Cossu D, Brezar V, Pacifico A, Ahmed Nand Mallone R, and Sechi LA. Antibodies recognizing mycobacterium avium paratuberculosis epitopes cross-react with the beta-cell antigen ZnT8 in sardinian type 1 diabetic patients. *PLoS One*, 6, pages 1–10, 2011.
- [106] Cossu D, Cocco E, Paccagnini D, Masala S, Ahmed N, Frau J, Marrosu MG, and Sechi LA. Association of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* with multiple sclerosis in Sardinian patients. *PLoS One*, 6, e18482, 2011.
- [107] Centro di Referenza Nazionale Qualità latte bovino e IZSLER - sez. Piacenza. *Istruzioni operative per il campionamento del latte di massa in allevamento*. [http://www.alimentisalute.it/doc/22102010\\_0001\\_regione\\_emilia\\_romagna.pdf](http://www.alimentisalute.it/doc/22102010_0001_regione_emilia_romagna.pdf).