

## **MYCOBACTERIUM AVIUM SUBSP. PARATUBERCULOSIS COME PATOGENO EMERGENTE IN LATTE CRUDO OVINO PRODOTTO NELL'ITALIA CENTRALE**

### **MYCOBACTERIUM AVIUM SUBSP. PARATUBERCULOSIS AS AN EMERGENT PATHOGEN IN RAW OVINE MILK PRODUCED IN CENTRAL ITALY**

Attili AR, Ngu Ngwa V, Pacifici L<sup>1</sup>, Prezioso S, Domesi A<sup>1</sup>, Cuteri V *Scuola di Scienze Mediche Veterinarie, Matelica; <sup>1</sup>ASUR 10, Regione Marche, Camerino.*

**Parole chiave:** ovino, latte, *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*, Sanità Pubblica  
**Key words:** ovine, milk, *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*, Public Health

**SUMMARY** - This study was performed to verify the safety of raw ovine milk and its role as vehicle of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (*MAP*) transmission. Milk samples from 697 randomly chosen adult sheep, reared in 17 dairy flocks situated in central Italy, were examined by combining Ziehl Neelsen (ZN) staining, bacteriological culture (BC) and indirect ELISA test. The milk ELISA was able to identify 70% of *MAP* infected ovine dairy farms. *MAP* infection was confirmed in 24.3% and 21.6% of milk ELISA positive samples (n=37) by ZN staining and BC, respectively. A fair (k=0.43) and slight (k=0.33) agreement were observed between ELISA–ZN and ELISA–BC, respectively. The presence of *MAP* in raw ovine milk produced in central Italy proved the risk of potential transmission to humans through consumption of milk and cheese manufactured from unpasteurised milk.

**INTRODUZIONE** - L'enterite paratubercolare o malattia di Johne e Frottingam (1895) è una malattia contagiosa cronica, incurabile, di tipo granulomatoso sostenuta da un patogeno versatile, *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (*MAP*), avente una vasta gamma di ospiti recettivi: i ruminanti domestici e selvatici oltre ad una serie di animali satelliti degli allevamenti (1). La trasmissione si realizza per via congenita e per via oro-fecale attraverso l'assunzione di alimenti e/o di acque contaminate e nei giovani animali mediante assunzione di colostro e latte infetto. Nella pecora sono state descritte tre forme, la paucibacillare, la multibacillare e la forma asintomatica. La malattia ha un decorso cronico caratterizzato da diminuzione dell'incremento ponderale, pelo ruvido ed opaco, disidratazione, diminuzione della produzione latte e ipofertilità; negli stadi più avanzati è frequente la comparsa di diarrea cronica, intermittente e dimagrimento progressivo. In tutto il mondo la Paratubercolosi è una malattia con un forte impatto economico per la diminuite produzioni e l'abbattimento precoce dei soggetti infetti (2). Il possibile ruolo di *MAP* nell'eziologia della Malattia di Chron nell'uomo non è nuovo. Dalziel, nel 1913, riferiva le analogie cliniche e istopatologiche tra la paratubercolosi degli animali, la tubercolosi intestinale e l'enterite granulomatoso cronica dell'uomo. Recenti studi hanno, inoltre, ipotizzato il coinvolgimento di *MAP* nella patogenesi del 70% dei casi di diabete di tipo I nell'uomo in Sardegna e in Inghilterra e, nel 40%, in Lombardia (3). *MAP*, se presente in alte concentrazioni nel latte, è in grado di resistere alla pasteurizzazione con conseguente rischio per la salute pubblica (4).

La crescente diffusione di impianti per la vendita diretta di latte crudo, seppur prevalentemente bovino, autorizzata dal Reg. (CE) 853/2004, e l'aumentato consumo di formaggi a base di latte non pasteurizzato hanno posto diverse problematiche igienico-sanitarie, con particolare riferimento al rischio di trasmissione di agenti zoonotici. L'obiettivo di questo studio è stato quello di stimare la prevalenza dell'infezione, il grado di sicurezza del latte crudo ovino e il suo ruolo come veicolo di trasmissione di *MAP* all'uomo in un territorio, le Marche, noto per la produzione di formaggi a base di latte crudo.

**MATERIALI E METODI** - L'indagine è stata svolta nel periodo compreso tra ottobre 2009 e luglio 2010 su un totale di 697 pecore di età superiore a due anni, selezionate casualmente da 17 aziende della regione Marche produttrici anche di formaggio a latte crudo. Gli animali erano di

razza Comisana, Massese, Fabrianese, Sarda, Sopravvissana, e incroci che, al momento del campionamento, erano ad inizio/fine o durante il picco di lattazione. Da ogni animale, previa disinfezione del capezzolo con clorexidina, sono stati raccolti circa 100 ml di latte che sono stati mantenuti a 4°C durante il trasporto al laboratorio e congelati a -20 in attesa delle indagini microbiologiche volte all'evidenziazione diretta e indiretta di *MAP*. Tutti i campioni di latte sono stati testati per la rilevazione di anticorpi anti-*MAP* mediante l'utilizzo di un kit Immunoenzimatico commerciale (ELISA Paratuberculosis screening kit; Institut Pourquier®, France) seguendo il protocollo che la casa produttrice raccomanda per il latte bovino. Brevemente, si è proceduto alla diluizione 1:2 dei campioni e al preadsorbimento dei sieri con *Mycobacterium phlei*, limitando la possibilità di reazioni crociate con micobatteri eterologhi e migliorando notevolmente la specificità del test ELISA. La prova risultava validata quando la densità ottica (OD<sub>450nm</sub>) del controllo positivo era  $\geq 0.350$  e il rapporto delle OD medie dei controlli positivi e negativi era  $\geq 3$ . I campioni di latte venivano registrati come positivi se mostravano uno score  $\geq 40\%$ , dubbi e negativi se lo score era, rispettivamente, compreso tra 30% e 40% o  $< 30\%$ . Tutti i campioni sono stati sottoposti a coltura batterica (CB) e alla colorazione di Ziehl Neelsen (ZN). L'isolamento di *MAP* è stato eseguito su Herrold's egg yolk medium (HEYM) contenente 2 µg di mycobactin J/ml seguendo il protocollo precedentemente sviluppato da Gao et al. (2005) (5). Un'aliquota di latte, 50 ml, veniva centrifugata a 3000 rpm per 30 minuti e il siero rimosso. Dopo l'aggiunta di 20 ml di benzalconio cloruro (0,3%) i campioni venivano lasciati a temperatura ambiente per 2 ore con agitazione ad intervalli di mezz'ora e sottoposti ad una centrifugazione finale a 2500 rpm per 10 minuti. Il surnatante veniva allontanato e il sedimento risospeso in 0,5ml di soluzione antibiotata (amphotericina B 50 mg, acido nalidixico 100 mg, vancomicina 100 mg, brodo BHI 18,5g/L, Sigma-Aldrich, Italia). Dopo incubazione a 37°C per 24 h, 0,2 ml della sospensione venivano seminati su HEYM e posti a 37°C per 16 settimane. I controlli periodici permettevano di individuare le colonie sospette e, mediante colorazione di ZN, evidenziare i tipici di cluster di bacilli acido resistenti.

L'analisi statistica dei risultati è stata condotta mediante il Software STATA versione 5 (STATA Corporation, College Station, Texas, USA) e le differenze valutate mediante il test del Chi quadrato. Valori di  $P < 0.05$  sono stati considerati significativi. Il grado di concordanza tra i test è stato stimato mediante il coefficiente kappa (k) statistico e il valore interpretato secondo quanto riportato da Holton et al. (1998) (6).

**RISULTATI** - Il test ELISA eseguito sul latte ovino ha permesso di identificare 12/17 (70%) aziende infette da *MAP*. Anticorpi sono stati evidenziati in 37 (5,3%) campioni di latte registrando una OD<sub>450nm</sub> media di  $1,5 \pm SD 0,8$ . In particolare il 7,8% (n=270) e il 3,7% (n=427,  $P=0.021$ ) delle pecore positive era, rispettivamente, ad inizio/fine e al picco di lattazione. L'infezione è stata confermata nel 24,3% e nel 21,6% dei campioni positivi all'ELISA (n=37), rispettivamente mediante colorazione ZN e BC (Tab. 1).

Tabella 1. Positività per *MAP* nel latte ovino di greggi della regione Marche mediante tre indagini diagnostiche.

	Positivi/ Totale	Percentuale
<b>ELISA</b>	37/697	5,3%
<b>Colorazione ZN</b>	9/37	24,3%
<b>CB</b>	8/37	21,6%

Una buona (k=0,43) e una lieve (k=0,33) concordanza è stata osservata, rispettivamente, tra ELISA-ZN e ELISA-CB. Considerando i campioni di latte con alti titoli anticorpali, una quasi perfetta concordanza (k=0.90) emerge sia tra ELISA-BC che tra ELISA-ZN.

**DISCUSSIONE** - In Italia, la normativa Intesa Stato Regioni del 25/1/2007 definisce i criteri di accettabilità del latte crudo venduto direttamente al consumatore o attraverso i distributori automatici, e individua i parametri analitici che devono essere rispettati per i principali agenti di natura batterica causa di infezioni alimentari. Questi parametri non includono patogeni emergenti importanti per la Salute Pubblica quale *MAP* (7-8). Molti Autori ipotizzano la trasmissione al consumatore, tramite il consumo di latte crudo, di diversi patogeni; tra questi, rivestono un ruolo di particolare importanza *E. coli* O157:H7, *Campylobacter* termofili, *Salmonella* spp., *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus* e *Yersinia enterocolitica*. La pericolosità di questi patogeni e quella di *MAP* e altri agenti zoonotici deve indurre ad un atteggiamento di cautela nel consumo di latte crudo.

In questo studio i risultati ottenuti suggeriscono che quasi 2/3 delle aziende campionate risulta infetto e che *MAP* è eliminato attraverso il latte. 8 (47,0%) e 12 (70,6%) dei 37 allevamenti di ovini da latte della regione Marche sono risultati positivi, rispettivamente, mediante coltura batterica e colorazione di ZN.

La tecnica ELISA di tipo indiretto, eseguita sul latte, si è mostrata significativamente più sensibile quando effettuata su pecore ad inizio/fine lattazione rispetto a quando eseguita su animali durante il picco di lattazione ( $P < 0,021$ ). Ciò è in accordo con i risultati di Williams e Millar (1979) (9) e Nielsen et al. (2002) (10), e potrebbe essere spiegato con la diminuzione della concentrazione di IgG durante il picco della lattazione per un effetto di diluizione dovuto all'aumentata produzione latte. Quanto confermato in questo studio mediante isolamento di *MAP* dal 21,6% dei campioni di latte crudo positivi all'ELISA, è inferiore a quanto riportato da Gao et al. (2009) (11) che isolava il microrganismo nel 34,6% (44/133) dei campioni ma superiore a quanto ottenuto in altri studi in cui si registrava un tasso di isolamento del 10,0% (12), dell'8,3% (13) e dell'11,7% (14).

L'indagine condotta ha permesso, inoltre, di rivalutare una tecnica immunoenzimatica, validata per il latte bovino, per il latte ovino, dimostrando che il protocollo può essere applicato anche per la specie ovina (15). In conclusione, i dati ottenuti da questo studio suggeriscono che la Paratubercolosi ovina sia molto diffusa nella regione Marche e che *MAP*, eliminato con il latte di pecore infette, rappresenta un potenziale rischio di infezione per l'uomo mediante il consumo di latte crudo e prodotti da esso derivati. Un approccio legislativo precauzionale dovrebbe dunque essere garantito dalle Autorità competenti per la salvaguardia della Salute Pubblica.

**BIBLIOGRAFIA** – 1) Pavlik I et al (2000) *Vet Microbiol*, 77 (3-4), 231-251. 2) Smith RL et al (2009) *J Dairy Sci*, 92 (6), 2653-2661. 3) Rosu V et al (2009) *PLoS One*, 4 (2), e4386. 4) Ellingson JL et al (2005) *J Food Prot*, 68 (5), 966-972. 5) Gao A et al (2005) *Can J Vet Res*, 69, 81-87. 6) Holton LL et al (1998) *J Am Vet Med Assoc*, 212 (1), 61-66. 7) Intesa Governo, Regioni e Province Autonome di Trento e Bolzano N.5 CSR (2007). 8) Autori Vari (2006) *The EFSA Journal* 347, 1-21. 9) Williams MR, Millar P (1979) *Res Vet Sci*, 26, 81-84. 10) Nielsen SS et al (2002) *J Dairy Sci*, 85, 2795-2802. 11) Gao A et al (2009) *Can J Vet Res*, 73(1), 58-64. 12) Ayele WY et al (2005) *Appl Environ Microbiol*, 71, 1210-1214. 13) Streeter RN et al (1995) *Am J Vet Res*, 56, 1322-1324. 14) Singh SV et al (2007) *Comp Immunol Microbiol Infect Dis*, 30, 175-186. 15) Ngu Ngwa V et al (2010) *Acts of XVIII FeMeSPRum*, 32-37.