

Ferrara, 11 ottobre 2012

Paratubercolosi: inquadramento eziologico, patogenetico, clinico- anatomopatologico, diagnostico ed epidemiologico



Norma Arrigoni

Centro Referenza Nazionale per la Paratubercolosi

Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia-Romagna

Sezione di Piacenza



CRN per la Paratubercolosi

Attivato dal Ministero della Salute nel 2003

Compiti principali:

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

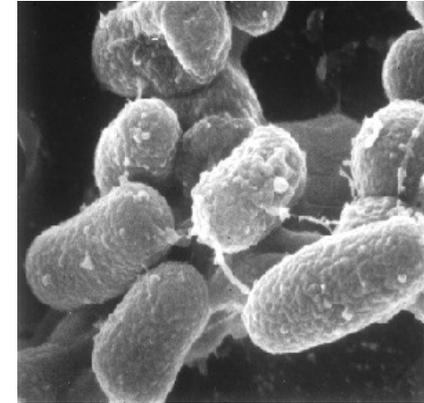


Sommario

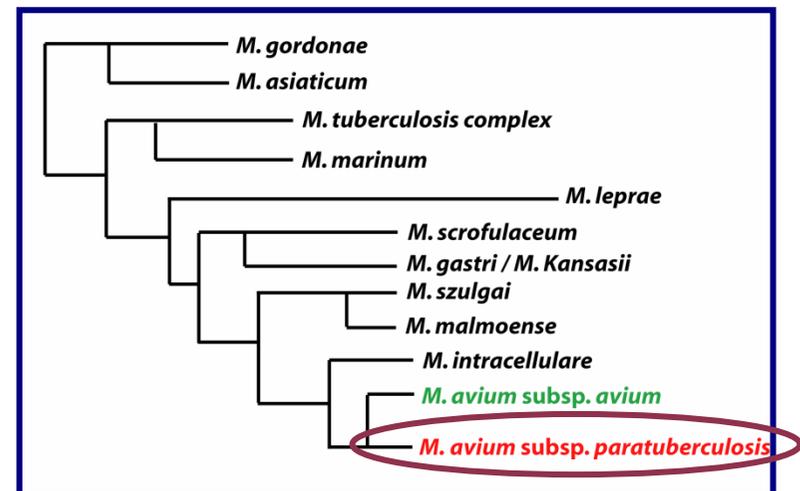
- Paratubercolosi:
 - L'agente azilogico (*M.avium* subsp. *paratuberculosis*, **Map**)
 - La malattia
- Motivi di preoccupazione:
 - Impatto economico
 - Diffusione in aumento
 - Scarsa sensibilità dei test
 - Assenza di terapie efficaci
 - Uso controverso della vaccinazione
 - Estrema resistenza nell'ambiente
 - Contaminazione della catena alimentare
 - Sospetto ruolo zoonosico



Tassonomia

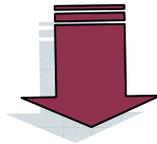


- **Prima descrizione:** Johne and Frothingham 1895
- “*Mycobacterium enteritidis chronicae pseudotuberculosis bovis Johne*” Twort e Ingram 1912
- “*Mycobacterium paratuberculosis*” Bergey et al. 1923
- “*Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis*” Thorel et al. 1990



Map: il genoma

- 4.83 mbp di cui 4.54 con 96-100% omologia con *Maa*



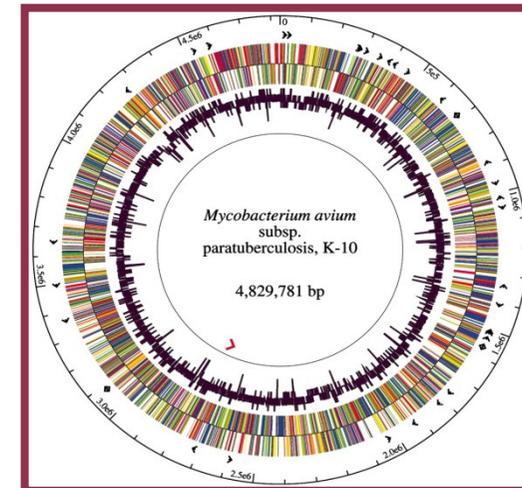
- 6% (289 kb) del genoma esclusivo di *Map*
- 1.5% del genoma costituito da DNA ripetuto

IS900

IS1311

ISMav2

IS_Map02



Li, Lingling et al. (2005) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 102, 12344-12349

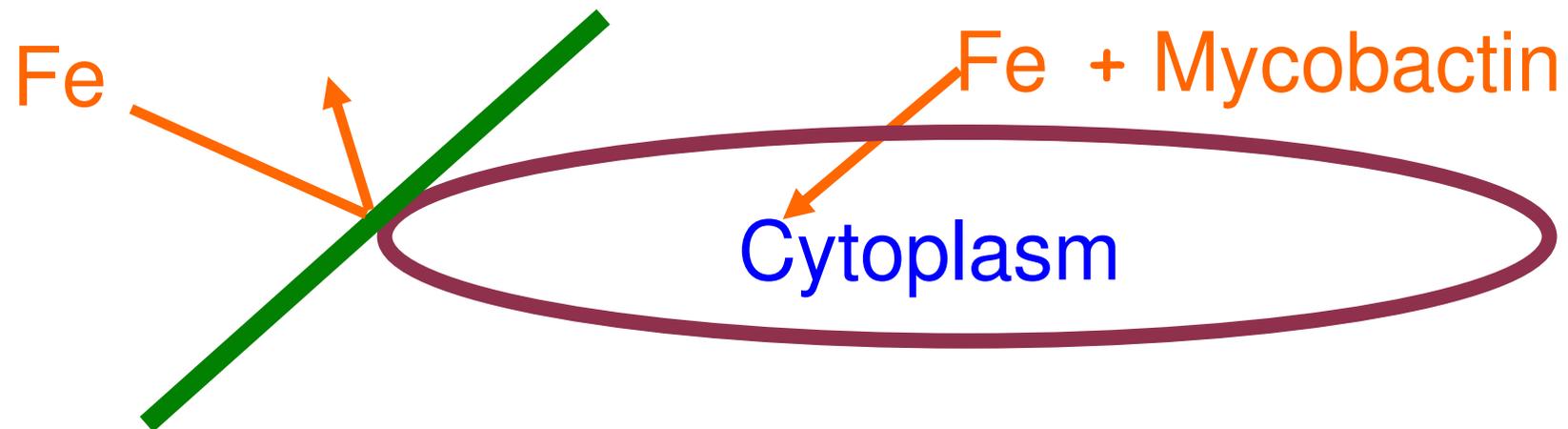
PNAS



Map: tre gruppi principali

	Type I	Type II	Type III
Pattern (IS900-RFLP and PFGE)	S (sheep)	C (cattle)	(intermediate)
Growth	Very slow	Slow	Very slow
Host preference	Sheep	Broad range of species	Sheep, Goat
Geographical distribution	Limited	Global	Limited

Map: cattura “*in vitro*” del mycobactin



- Meccanismo della cattura *in vivo* sconosciuta
- Mycobactin-dipendenza: not solo Map!!

Ruminanti selvatici recettivi

Daino (*Dama dama*)

Capriolo (*Capreolus capreolus*)

Cervo (*Cervus elaphus*)

Cervo dalla coda bianca (*Odocoileus virginianus*)

Stambecco (*Capra ibex*)

Muflone (*Ovis musimon*)

Capra selvatica (*Capra aegagrus*)

Pecora a grandi corna (*Ovis canadensis*)

Alpaca (*Lama pacos*)

Alce (*Alces alces*)

Bisonte (*Bison bison*)

Dato che gli stessi profili (PFGE, IS900-RFLP, MIRU-VNTR) si evidenziano in ceppi isolati da differenti specie, la trasmissione inter-specie è molto probabile (Stevenson K. et al., BMC Microbiology 2009, 9: 212)



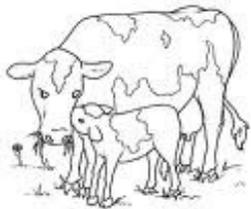
Spettro d'ospite: specie non ruminanti

Lagomorfi	Lepre, Coniglio selvatico
Carnivori	Volpe, Furetto, Gatto selvatico, Ermellino, Donnola
Roditori	Topo, Ratto, Arvicola
Altre specie	Cinghiale, Orso, Procione, Tasso, Opossum, Armadillo, Rinoceronte, giraffa
Uccelli	Corvo, taccola
Primati	Scimmia, Uomo?
Invertebrati	Ditteri, Scarafaggi, Lombrichi



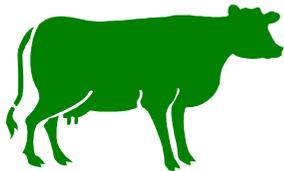
Patogenesi

Esposizione



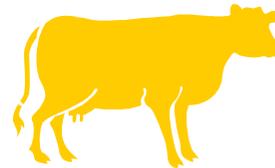
Età
Dose infettante
Frequenza esposizione
Suscettibilità genetica

Resistenza

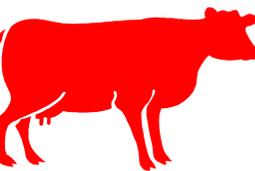


Predisposizione genetica

Infezione



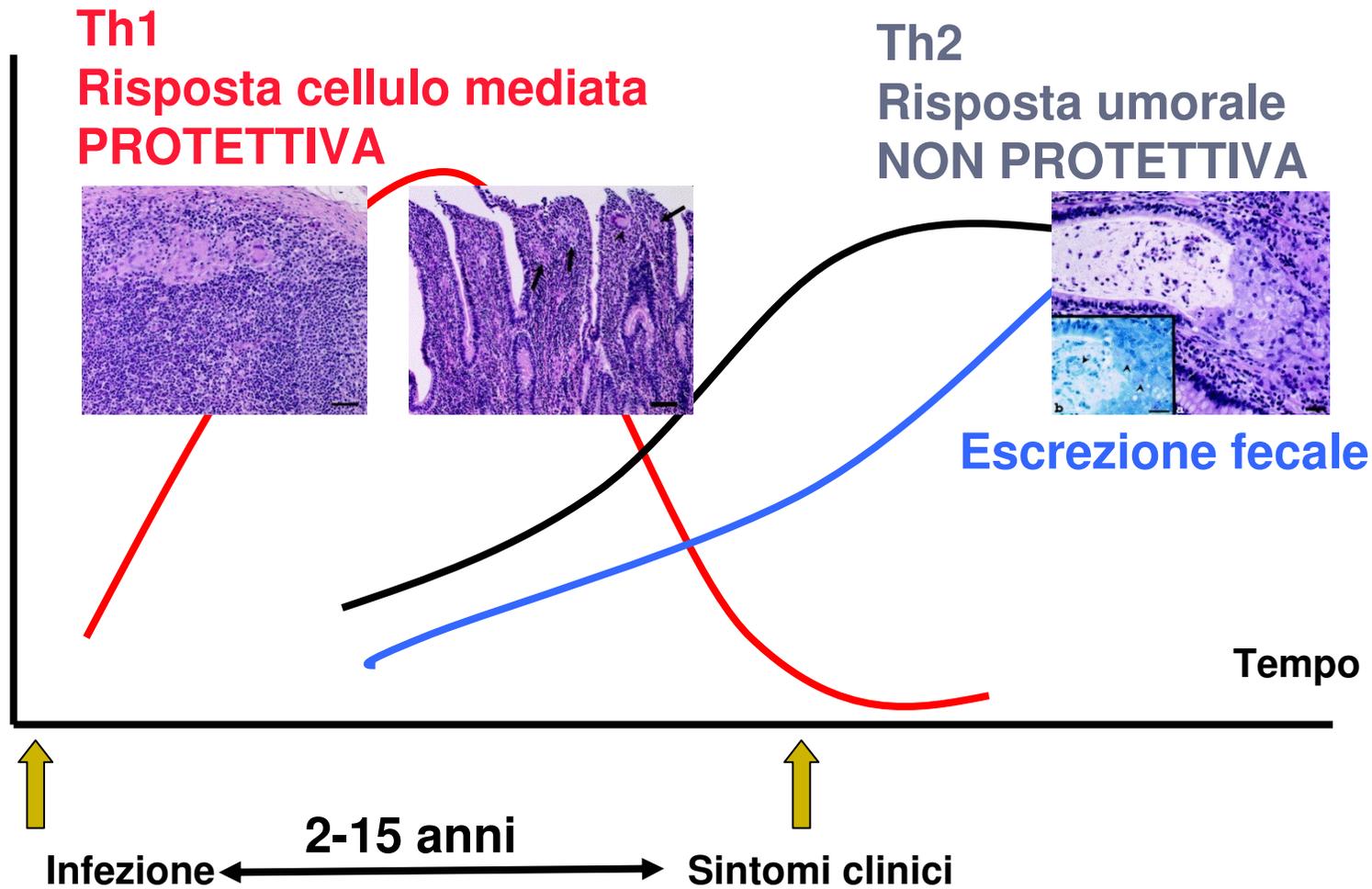
Parto
Alimentazione scadente
Elevata produzione latte
Infestazioni parassitaria
Pascolo su terre carenti in minerali



Sintomi clinici

Patogenesi

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





Arrigoni - IZS PC

Bologna, 29 giugno 2012





Arrigoni - IZS PC

Ferrara, 11 ottobre 2012





Arrigoni - IZS PC
Ferrara, 11 ottobre 2012





Lillini – IZS RM

Ferrara, 11 ottobre 2012





Lillini – IZS RM

Ferrara, 11 ottobre 2012





Arrigoni – IZS PC

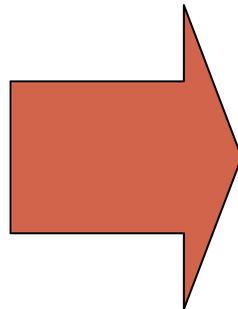
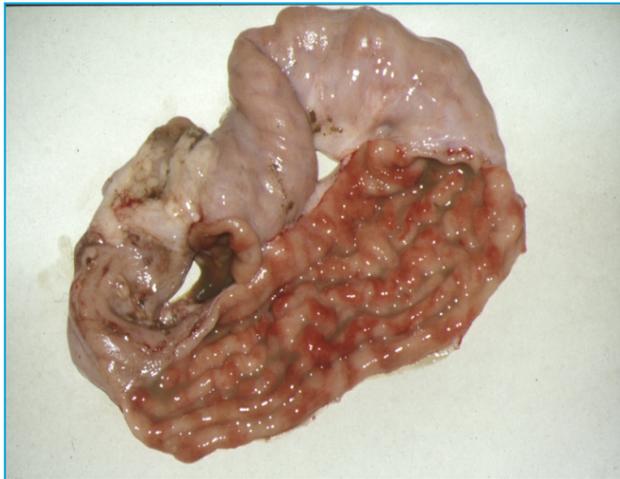
Ferrara, 11 ottobre 2012



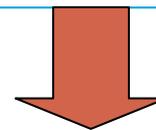
Patogenesi

Intestino

(Ileo, valvola ileo-cecale e linfonodi)



Fegato
Mammella
Utero
Rene
Polmoni
Cuore
Linfonodi



Feci

Latte, colostro, seme, feto

Epidemiologia

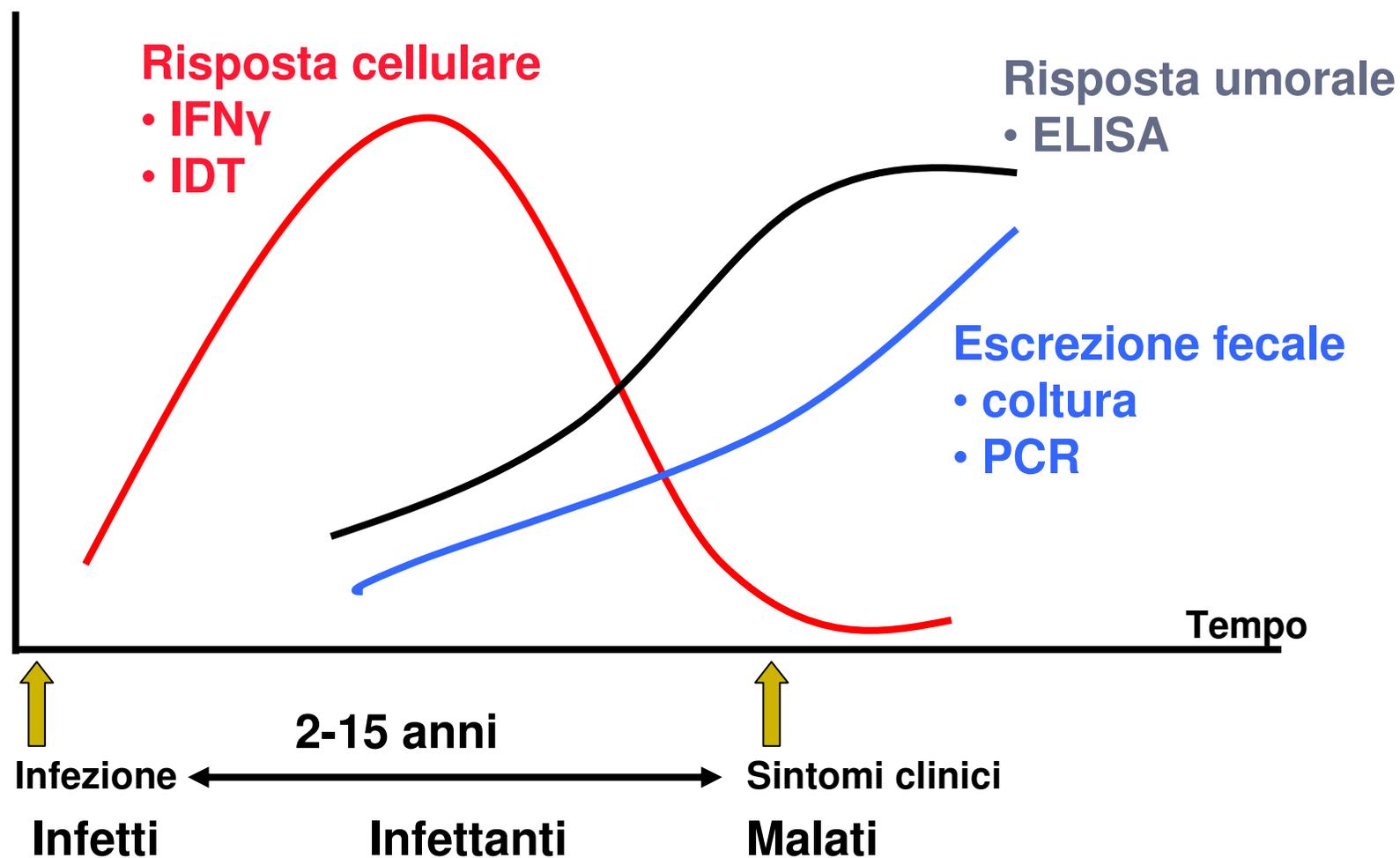
2 principali vie di trasmissione:

- Ingestione (fecale-orale)
 - Alimenti ed acqua contaminati
 - Latte
 - Colostro
- Verticale

Embryo transfer?
FA?
Via aerogena?



Diagnosi di Paratubercolosi



PCR: punti critici

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



ELISA

- Rapido
- Basso costo
- Elevato rapporto costo/beneficio
- Sangue o latte individuale
- Alta specificità (0.99)

MA:

- Sensibilità limitata
 - Età (Latte: 0.22 a 2 anni, 0.58 a 3 anni, 0.74 a 4 anni, 0.8 a 5 anni) (Nielsen 2012)
 - Stadio di infezione



Test ELISA: sensibilità

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

Malati

**Escrezione
Sintomi 87%**

Infettanti

**Escrezione
No sintomi
HS 75%
MS 50%
LS 15%**

Infetti

**No escrezione
No sintomi <10%**





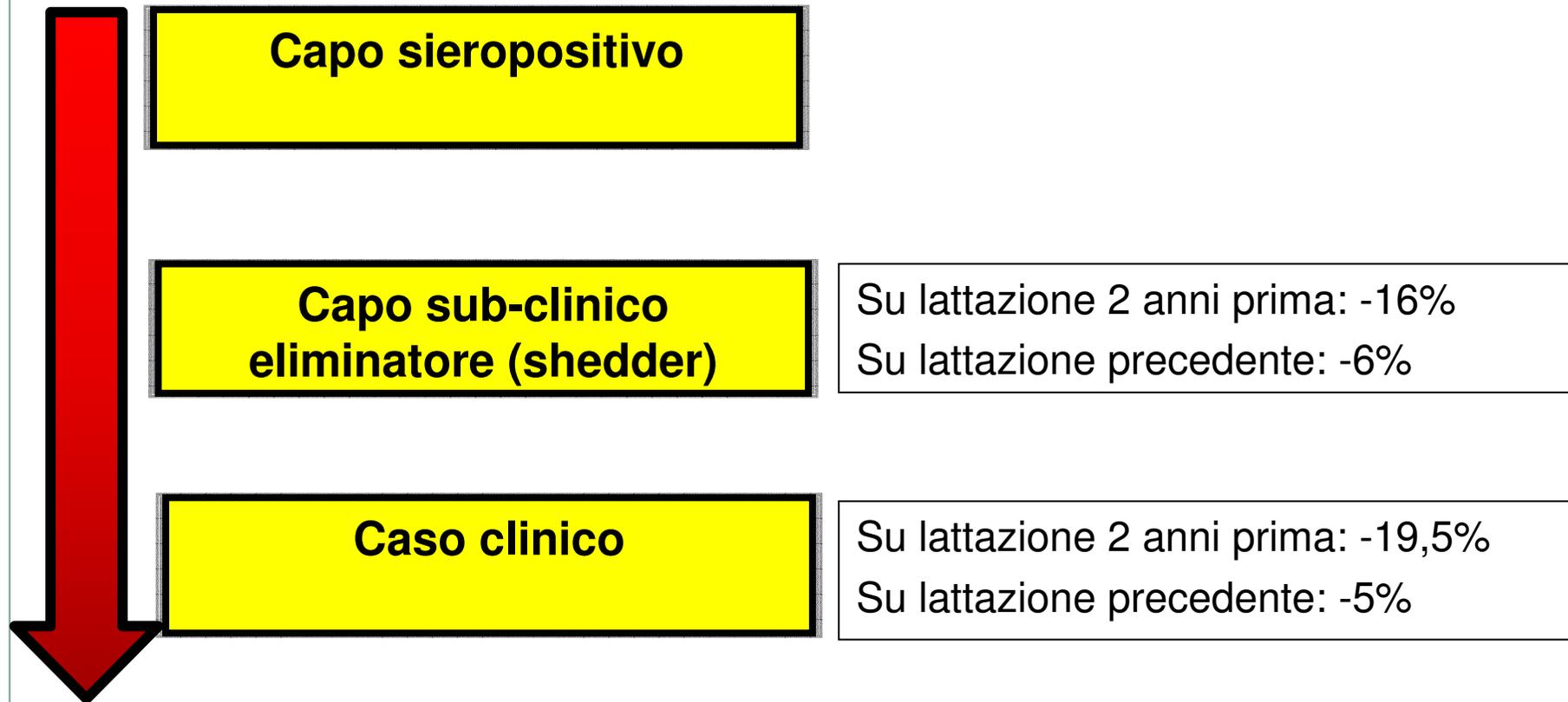
Perchè preoccuparsi?

Impatto economico



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

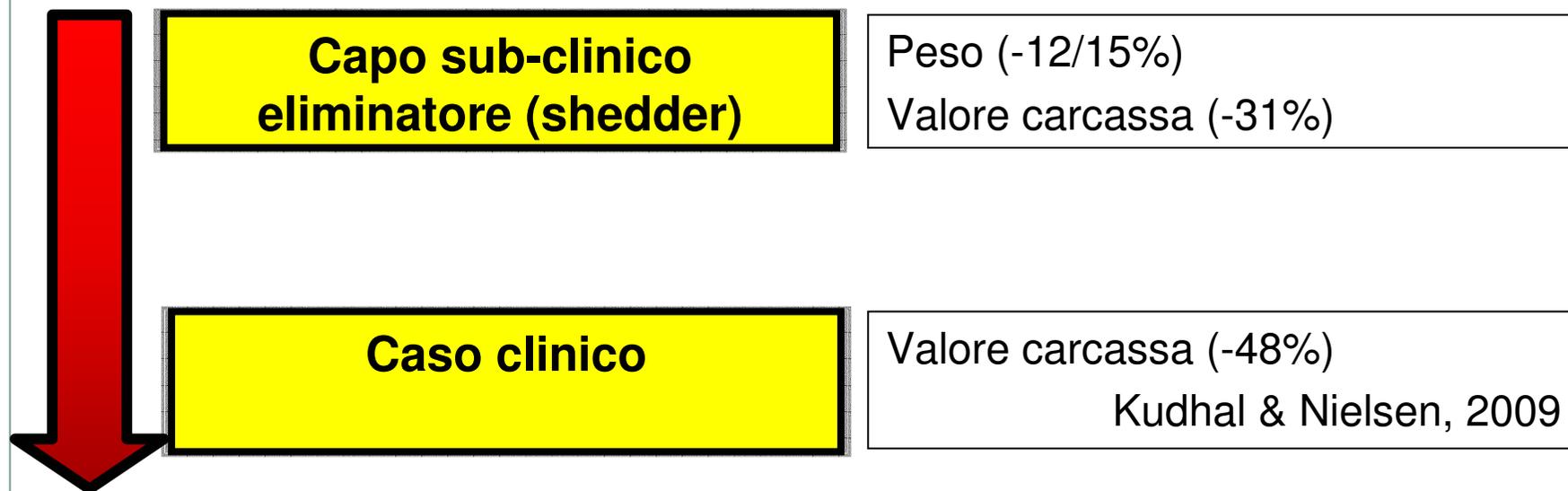
Calo produzione lattea (Benedictus et al, 1987)



Perdite:

- da 590 a 1350 Kg di latte per lattazione*0,38 euro= 224-513 euro
- da 7724 a 10972 Kg di latte totali*0.38 euro=2935-4136 euro

Calo ponderale e valore carcassa



Caso clinico: deprezzamento di 516 euro (Richardson e More 2009)

Riforma anticipata

- Riforma prima della massima potenzialità produttiva (3^o lattazione)
- 75% dei «Shedders» è riformato prima della fine della lattazione:
 - 52% per insorgenza sintomi clinici
 - 48% per altri motivi (calo produzione, infertilità)(Raizman,2009)
- Rispetto ai capi negativi, il rischio di essere riformati è:
 - ELISA+: OR 1,38 (CI95%: 1,05-1,81) (Tiwari & al.,2005)
 - Shedders: OR 3,0 (CI95%: 1,6-5,8) (Raizman & al.,2009)
- Rispetto ai capi negativi, la durata della vita produttiva è:
 - ELISA+: -2,85 (\pm 0,63) mesi
 - Shedders: -3,26 (\pm 1,48) mesi (Gonda & al.,2007):

Aumento della Mortalità

- Rispetto agli allevamenti negativi, negli allevamenti positivi la mortalità delle vacche è risultata maggiore del 22% (+0.82 ogni 100 vacche) (Ott & al., 1999)
- Non sono presi in considerazione i costi per lo smaltimento delle carcasse



A review of prevalences of paratuberculosis in Europe

Nielsen, 2008, Prev. Vet. Med



Table 5

Summary of herd level apparent prevalences of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* infections in cattle in Europe, published from January 1990 to April 12, 2007

Country/region	Year	Test	Age	n	T+	HAP (%)	Critical issues*	Reference**
Belgium/ all	1997–1998	HerdChek, IDEXX, France	>2 years	458	82	18	A, D	Boelaert et al. (2000)
Denmark/all	1998	Bulk tank milk ELISA	NA	900	497	55	D	Nielsen et al. (2000) ^a
France/Yonne	1998–1999	Pourquier ELISA	All	155	105	68		Petit (2001)
Germany/Saxony	2002–2004	HerdChek, IDEXX, Wörrstadt, Germany	?	493	207	42	B	Donat et al. (2005) ^b
Italy/Latium	?	HerdChek, IDEXX		369	155	42	A	Lillini et al. (2005)
Italy/Veneto	2000–2001	HerdChek, IDEXX	>12 months	419	272	65		Robbi et al. (2002)
Italy/Verona	1997–1998	Tissue culture and histopathology	?	73	5	7		Vicenconi et al. (1999) ^f
Norway/all	2002	Faecal culture	Five oldest in herd	200	2	10	B	Mørk et al. (2003) ^e
Rep. of Ireland/all	2000–2001	Bulk tank milk IS900 PCR	NA	389	50	13	D	O'Reilly et al. (2004)
Slovenia/all	1997	HerdChek, IDEXX, USA		1,690	48	3	A	Ocepek et al. (1999)
Slovenia/all	1998	HerdChek, IDEXX, USA		2,423	157	7	A	Ocepek et al. (1999)
Slovenia/all	2000–2001	Pourquier ELISA	>2 years	302	35	12	A	Ocepek et al. (2002)
Slovenia/all	1999	HerdChek, IDEXX, Sweden		26,088	1055	4	A	Ocepek et al. (2002)
Spain/all	?	Bulk tank milk IS900 PCR	Lactating cows	70	7	10	D	Sevilla et al. (2002)
Spain/Northern Spain	?	Bulk tank milk IS900 PCR	Lactating cows	200	16	8	D	Sevilla et al. (2002)
Sweden/all	2000–2001	Faecal culture	?	200	0	0	A, C	Stemberg and Viske (2003) ^g
Switzerland/North-east, central and north-west	2000–2001	Bulk tank milk IS900 PCR	Cows	501	112	22	D	Stephan et al. (2002) ^h
Switzerland/all	1993–1994	Parachek ELISA	?	113	9	8	A	Stärk et al. (1997)
Switzerland/all	2001	Bulk tank milk IS900 PCR	Cows	1,384	273	20	D	Corti and Stephan (2002)
Switzerland/?	2005	Bulk tank milk F57 PCR		100	3	3	D	Bosshard et al. (2006) ^h
The Netherlands/all	1998	HerdChek, IDEXX, Scandinavia	≥3 years	371	200	54	A	Muskens et al. (2000)
Turkey/?		ELISA, in-house	>2 years	545	206	38		Atala and Akcay (2001)
United Kingdom/England and border regions of Wales	1995	Observations by farmers in 1993 & 94	?	2,801	486	17	D	Cetinkaya et al. (1998) ⁱ

Abbreviations: n, Number of herds test; T+, number of test-positive herds; HAP, herd level apparent prevalence; NA, not applicable.

Migliore stima prevalenza reale:
50% allevamenti
20% animali

La situazione italiana

preventive veterinary medicine 102 (2011) 83–86



ELSEVIER

Contents lists available at ScienceDirect

Preventive Veterinary Medicine

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



Short communication

Prevalence of paratuberculosis infection in dairy cattle in Northern Italy

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

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

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

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

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

Assenza di terapie efficaci



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

Vaccinazione



VANTAGGI

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

SVANTAGGI

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

Resistenza di Map

- 163 giorni in acqua di fiume
- 336 giorni in acqua stagnante
- 1210 giorni nel suolo
- 330 giorni nelle feci
- 98 giorni (15 °C) - 252 giorni (5 °C) nel liquame



Map non è in grado di moltiplicarsi nell'ambiente

Critical Reviews in Microbiology, 2012; 38(1): 52–93
© 2012 Informa Healthcare USA, Inc.
ISSN 1040-841X print/ISSN 1549-7828 online
DOI: 10.3109/1040841X.2011.638273

informa
healthcare

REVIEW ARTICLE

Crohn's disease and the mycobacterioses: A quarter century later. Causation or simple association?

Rodrick J. Chiodini¹, William M. Chamberlin², Jerzy Sarosiek³, and Richard W. McCallum²

¹From the Divisions of Infectious Diseases, ²Gastroenterology, and ³The Molecular Medicine Research Laboratory, Department of Internal Medicine, Paul L. Foster School of Medicine, Texas Tech University Health Sciences Center, El Paso, Texas, USA

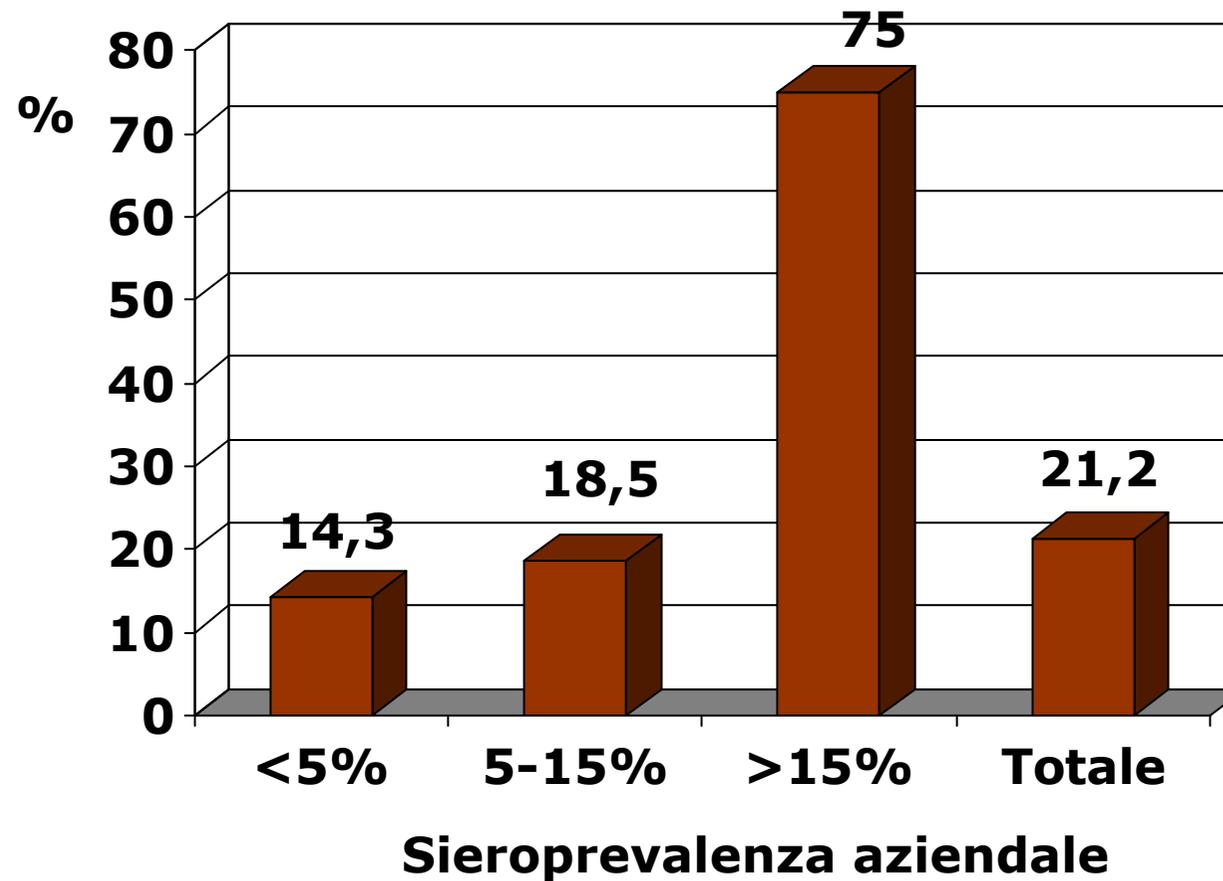


Presenza di Map nella catena alimentare

- Presente nel latte di massa di allevamenti infetti
- Resiste alle normali condizioni di pastorizzazione
- Nei formaggi resiste vivo e vitale
- Nelle carni può essere presente
- Nelle acque può rappresentare un rischio
- Contamina anche vegetali coltivati su terreni contaminati



Aziende produttrici di latte contaminato in funzione della sieroprevalenza aziendale



Arrigoni 2007



Studi di sopravvivenza su latte pastorizzato HTST



Riferimento	Paese	Vol (ml)	Sopravvivenza	Decontaminazione
Grant, 2002 e 2005	UK	50	Si	Nessuna / HPC
Hammer, 2002	D	50-100	Si	Nessuna
Pearce, 2001	NZ	50	No	HPC / 50 min
McDonald, 2005	AUS	1500	Si	HPC
Ayele, 2005	CZ	50	Si	HPC
Rademaker, 2007	NE	40	No	HPC

Riduzione pari a 4-7 log
Rischio: funzione del livello iniziale di contaminazione



Sorveglianza su prodotti in commercio: latte pastorizzato e derivati



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

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



Studi di sopravvivenza di Map nei formaggi



D value

Formaggi freschi 59,9 giorni

Formaggi semiduri 45,5 giorni

Formaggi duri 27,8 giorni

Partendo da latte con 10^5 Map/ml, per ottenere livelli di Map non rilevabili in coltura, sono necessari:

- 140 gg (formaggi duri)
- 230 gg (formaggi semiduri)
- 300 gg (formaggi freschi)

(Sung, 2000; Spahr, 2002)



Ulteriore motivo di preoccupazione!!

Garanzie sanitarie richieste per l'esportazione:

- **India:**

I prodotti lattiero caseari devono aver subito un trattamento tecnologico di provata efficacia verso Map

- **Cina:**

Negli allevamenti d'origine degli animali, negli ultimi 12 mesi, non è stato segnalato ufficialmente alcun sintomo riferibile a infezione da paratubercolosi (=paratubercolosi clinica)



SITI DA CONSULTARE

CRN Paratubercolosi, IZSLER

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

Johne's Information Center

<http://johnes.org>

Johne's Information Central

<http://johnesdisease.org>

USDA-APHIS Johne's Disease Information

http://www.aphis.usda.gov/animal_health/animal_diseases/johnes/index.shtml

John's Disease Veterinary Certificate Program

<http://vetmedce.vetmed.wisc.edu/jdvcp/>

Animal Health Australia

http://www.animalhealthaustralia.com.au/programs/jd/jd_home.cfm

Danish Control Program on bovine paratuberculosis

http://www.landbrugsinfo.dk/Kvaeg/Sundhed-og-dyrevelfaerd/Paratuberkulose/Sider/Op_Paratb_UK.aspx

