

# **PARATUBERCOLOSI**

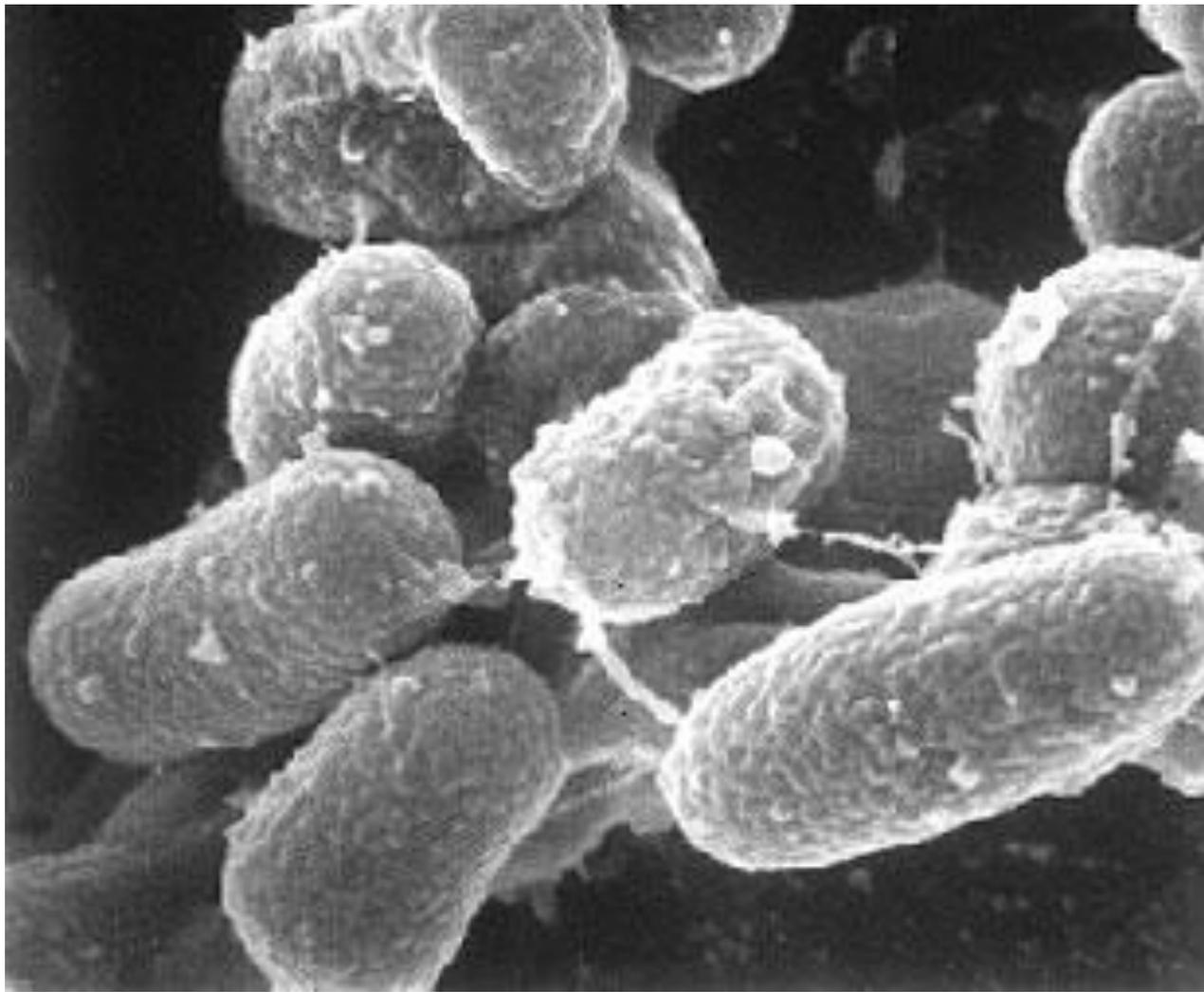
## **Malattia di Johne**

# Aspetti generali

- **Enterite infettiva cronica**
- **Colpisce ruminanti domestici e selvatici**
- **Si manifesta clinicamente nell'adulto**
- **Implicazioni zoonosiche (???)**
  - **Morbo di Crohn (ileite cronica) nell'uomo (5.6 nuovi casi per 100000 abitanti all'anno nella UE)**
  - **Resiste a pasteurizzazione del latte**

# Eziologia

- ***Mycobacterium avium subsp. Paratuberculosis (MAP)***
  - **Caratteristiche**
    - Acidoresistente, immobile, bastoncellare; 1 – 2  $\mu\text{m}$  \* 0,5  $\mu\text{m}$
    - Aerobio e a crescita estremamente lenta (10 – 14 settimane), colonie piccole ( $\varnothing$  1 – 5 mm), convesse, in genere non pigmentate
    - Spesso endocellulare
  - **Coltivabilità**
    - Necessita di micobattine per il metabolismo respiratorio (trasporto Fe)
  - **Terreni**
    - Addizionati di tuorlo d'uovo e micobattina
    - Dorset, Dubos, Herrold, Middlebrook, Smith



*M. avium subsp. paratuberculosis*



**Colonie di *M. avium*  
subspec. *paratuberculosis*  
cresciuto in Middlebrook  
agar (senza Tween 80)**

# Eziologia

- **Resistenza**
  - sopravvivenza in feci, acque e suolo (meglio se acido) > 1 anno
  - resiste a acidi e alcali
  - inattivato da calore, formalina, disinfettanti fenolici, ipoclorito di calcio
- **Antigeni**
  - correlazione con altri micobatteri

# Resistenza di *M. avium* subsp. *paratuberculosis*

## Tempi di sopravvivenza

- 163 giorni in acqua di fiume
- 270 giorni in acqua stagnante
- 517 giorni in acqua a pH neutro
- 1210 giorni nel suolo
- **11 mesi nelle feci** (il materiale fecale rimosso dovrebbe essere stoccato per tempi superiori all'anno prima di essere disperso)
- 7 giorni nelle urine
- **12 mesi a basse T°, terreni argillosi, umidità elevata**

## Inattivato da

- calore (sopravvive a pasteurizzazione e trattamento UHT)
- formalina (5%), fenolo (2,5%), ipoclorito di calcio (non utilizzabili in presenza di animali o su strutture metalliche)
- luce (UV) e disseccamento

# Resistenza di *M. avium* subsp. *paratuberculosis*

Resiste 55 settimane  
al riparo della luce



Contamina prati e pascoli

Contamina le  
acque superficiali



# MAP nell'acqua

- Si localizza all'interno dei biofilm
- Si moltiplica e resiste fino a 4 anni all'interno di amebe (*Acanthamoeba polyphaga*), ubiquitarie nelle acque



Maggiore resistenza ai trattamenti di clorazione rispetto alle cellule libere

A seguito di clorazione (0.5-2 µg/ml):

- riduzione di 0.78-1.73 log<sub>10</sub> (cellule libere)
- riduzione di 0.16-0.94 log<sub>10</sub> (cellule fagocitate)

(Whan 2006)

Biofilm: aggregazione complessa di microrganismi contraddistinta dalla secrezione di una matrice adesiva e protettiva e spesso anche da:

- adesione ad una superficie anche inerte
- una matrice extracellulare di sostanze polimeriche, spesso di carattere polisaccaridico

**La clorazione  
dell'acqua non inattiva  
Map!!**

# Epidemiologia

## –Diffusione

- **Cosmopolita, prevalente in aree temperate a clima umido**

–USA: 3-18 % di bovini positivi

–Australia: 14-17 % allevamenti positivi

–UE % bovini positivi

Spagna	1%	Inghilterra	2%
--------	----	-------------	----

Belgio	12%	Svizzera	6%
--------	-----	----------	----

Francia	7%	Danimarca	9%
---------	----	-----------	----

Italia Diverse indagini: 1 – 10%

Table 3

Animal level apparent prevalences of infection with *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in cattle in Europe, reported in literature January 1990 to April 12, 2007

Country/region	Study period	Test	Age-group	n	T+	AP (%)
Austria/all	?	ELISA, Svanovir	Cull cattle >2 years	756	144	19.0
Austria/four regions	1995–1997	ELISA, Allied	Four oldest/herd	11,028	664	6.0
Belgium/all	1997–1998	HerdChek, IDEXX, France	>2 years	13,150	116	0.9
France/Yonne	1998–1999	Pourquier ELISA	All	8,793	292	3.3
Germany/Saxony	2002–2004	HerdChek, IDEXX, Würzburg, Germany	?	3,454	151	4.4
Germany/Arnsherg	1993	ELISA, in-house	Cull cattle >18 months	536	79	15
Germany/Arnsherg	1993	Tissue culture	Cull cattle >18 months	517	7	1.4
Germany/Bavaria	2005	HerdChek, IDEXX, Würzburg, Germany	?	2,748	41	1.5
Germany/Bavaria	2005	Pourquier ELISA	?	2,748	25	0.9
Germany/Bavaria	2005	ELISA, Svanovir	?	2,748	663	24
Italy/Latium	?	HerdChek, IDEXX	?	19,627	472	2.4
Italy/Veneto	2000–2001	HerdChek, IDEXX	>12 months	27,135	949	3.5
Italy/Verona province	1997–1998	Tissue culture + histopathology	?	73	5	6.8
Norway/?	1996–1997	HerdChek, IDEXX	?	9,456	728	7.7
Norway/all	2002	Faecal culture	Five oldest in herd	1,592	2	0.1
Rep. of Ireland/imported animals	1997	Parachek ELISA	?	225	8	3.6
Slovenia/all	1997	HerdChek, IDEXX, USA	?	11,513	47	0.4
Slovenia/all	1998	HerdChek, IDEXX, USA	?	12,082	140	1.2
Slovenia/all	2000–2001	Pourquier ELISA	>2 years	9,388	41	0.4
Slovenia/all	1999	HerdChek, IDEXX, Sweden	?	18,469	1305	7.1
Sweden/all	2000–2001	Faecal culture	?	4,000	0	0.0
Sweden/all	1995–1996	Tissue culture	>2 years	3,166	1	0.0
Switzerland/Plateau de Diesse	?	Parachek ELISA, CSL, Australia	>18 months	565	29	5.1
Switzerland/all	1993–1994	Parachek ELISA, CSL, Australia	Dairy	1,663	12	0.7
Switzerland/?	2005	MAP IS7 PCR	Cull cattle	101	20	19.8
The Netherlands/all	1998	HerdChek, IDEXX, Scandinavia	Dairy ≥3 years	15,745	400	2.5
Turkey/?	?	ELISA in-house	>2 years	8,873	409	4.6
Turkey/Trakya	?	IS900 PCR in faecal samples	?	96	0	0.0
Turkey/Elaçig	1997–1998	IS900 PCR in milk	Dairy >2 years	500	25	5.0
United Kingdom/South west England	1994	IS900 PCR on lymph nodes	Cull cattle	1,297	46	3.5
United Kingdom/South west England	1994	Tissue culture of T+ from IS900 PCR	Cull cattle	1,297	34	2.6

Abbreviations: AP, Apparent prevalence; FC, faecal culture; n, number tested; T+, test-positive.

**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 <sup>+</sup>	HAP (%)	Critical issues <sup>†</sup>
Belgium/all	1997-1998	HerdChek, IDEXX, France	>2 years	458	82	18	A, D
Denmark/all	1998	Bulk tank milk ELISA	NA	900	497	55	D
France/Tonne	1998-1999	Pouquaier ELISA	All	155	105	68	
Germany/Saxony	2002-2004	HerdChek, IDEXX, Wörrstadt, Germany	?	493	207	42	B
Italy/Latium	?	HerdChek, IDEXX		309	155	42	A
Italy/Veneto	2000-2001	HerdChek, IDEXX	>12 months	419	272	65	
Italy/Verona	1997-1998	Tissue culture and histopathology	?	73	5	7	
Norway/All	2002	Faecal culture	Five oldest in herd	200	2	10	B
Rep. of Ireland/all	2000-2001	Bulk tank milk IS900 PCR	NA	389	50	13	D
Slovenia/all	1997	HerdChek, IDEXX, USA		1,690	48	3	A
Slovenia/all	1998	HerdChek, IDEXX, USA		2,423	157	7	A
Slovenia/all	2000-2001	Pouquaier ELISA	>2 years	302	35	12	A
Slovenia/all	1999	HerdChek, IDEXX, Sweden		26,088	1055	4	A
Spain/all	?	Bulk tank milk IS900 PCR	Lactating cows	70	7	10	D
Spain/Northern Spain	?	Bulk tank milk IS900 PCR	Lactating cows	200	16	8	D
Sweden/all	2000-2001	Faecal culture	?	200	0	0	A, C
Switzerland/North-east, central and north-west	2000-2001	Bulk tank milk IS900 PCR	Cows	501	112	22	D
Switzerland/all	1993-1994	Parachek ELISA	?	113	9	8	A
Switzerland/all	2001	Bulk tank milk IS900 PCR	Cows	1,384	273	20	D
Switzerland/?	2005	Bulk tank milk F57 PCR		100	3	3	D
The Netherlands/all	1998	HerdChek, IDEXX, Scandinavia	≥3 years	371	200	54	A
Turkey/?		ELISA, in-house	>2 years	545	206	38	
United Kingdom/England and border regions of Wales	1995	Observations by farmers in 1993 & 94	?	2,801	486	17	D

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

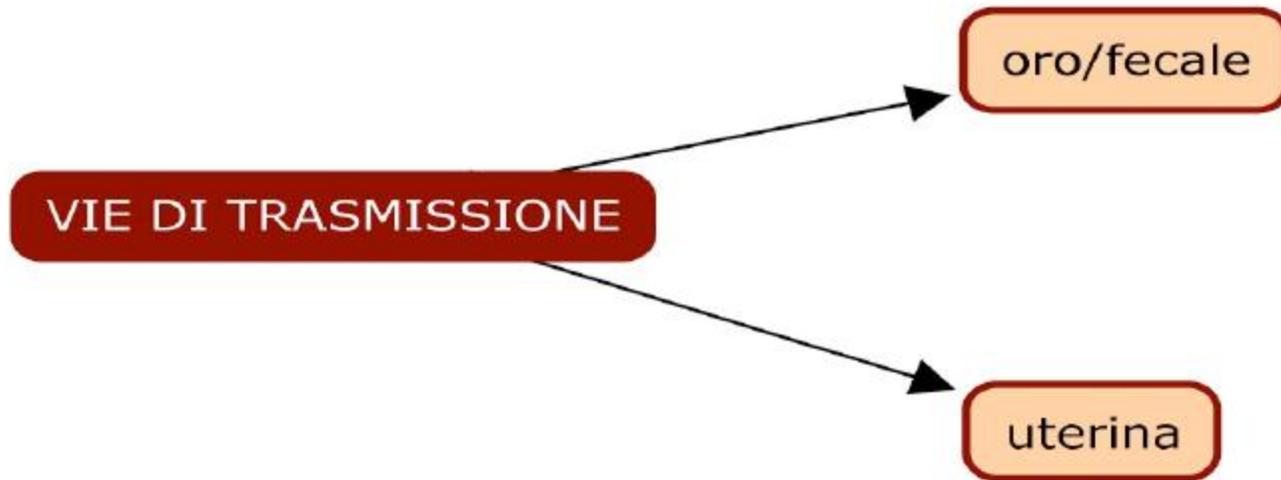
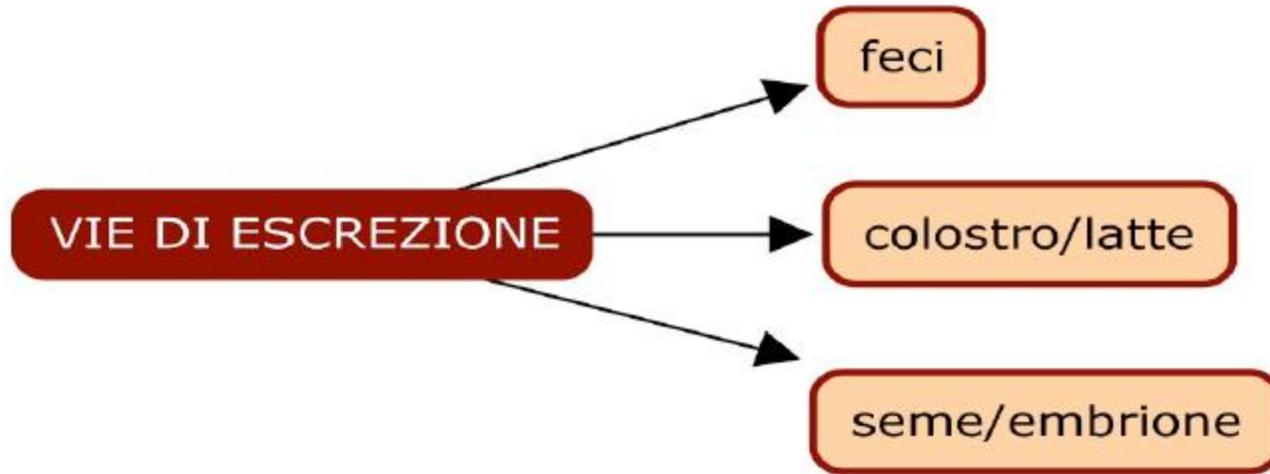
# Epidemiologia

- Ospiti
  - Bovini (resistenza età dipendente); ovicaprini, ruminanti selvatici, camelidi, conigli selvatici, volpi, mustelidi, cani
- Trasmissione
  - **Materiale infettante**
    - Feci dei soggetti infetti
    - colostro e latte ( $\pm 10\%$  di vacche con forma subclinica e  $\pm 35\%$  di vacche elimina col latte)
    - seme di tori infetti (raro), embryo transfer (basso rischio)
  - **Vie di trasmissione**
    - Via orale
    - Via transplacentare ( $\pm 10\%$  di feti di vacche con forma subclinica e  $\pm 40\%$  di feti di vacche con forma clinica sono infetti)

I vitelli devono essere considerati ad alto rischio di infezione fino ai 30 giorni di età e altamente recettivi fino ad 1 anno di vita

In questo periodo la principale fonte di infezione è rappresentata dall'allattamento naturale:

- mammella della madre facilmente imbrattata da feci
- $\pm$  35% di animali con forma clinica e  $\pm$  10% di animali con forma subclinica eliminano MAP in colostro e latte



# Epidemiologia

- Introduzione dell'infezione in un allevamento:
  - introduzione capi infetti
  - contatti diretti o indiretti (pascoli, abbeverate)  
con animali domestici o selvatici infetti

# **Epidemiologia - Fattori condizionanti**

- natura del terreno (argilloso, umido, acido -  
aumenta la disponibilità di Fe)**
- squilibri alimentari (Cu, Mn, Se, vit. E ....)**
- età**
- stress in senso lato**
- elevate produzioni**
- parto e puerperio**
- infezioni e infestazioni concomitanti**
- prevalenza infezione in allevamento**

# Patogenesi

VIA ORALE →

Epitelio ileo e colon. Le cellule M, a livello delle placche del Peyer, trasportano l'agente dal lume attraverso la mucosa → fagocitosi da parte dei macrofagi inter e subepiteiali

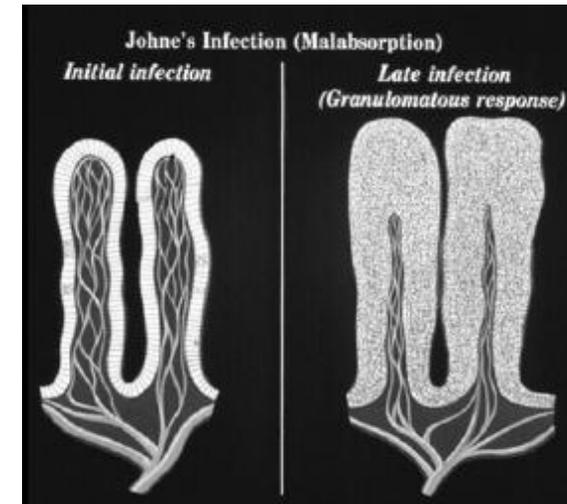


MACROFAGI

Parassitismo intracellulare, resistenza alla fagocitosi, moltiplicazione, rilascio di citochine → risposta infiammatoria, lesioni granulomatose nell'intestino, vasi linfatici e linfonodi regionali → atrofia dei villi, malassorbimento, perdita proteine plasmatiche, diarrea, ipoproteinemia



Moltiplicazione con progressivo aggravamento delle lesioni. L'animale può divenire anergico → batteriemia e invasione di vari organi



# Patogenesi



FORMA CLINICA

← Incubazione:  
2-5 anni



Reazione granulomatosa:  
Intestino a scala di corda  
(enterite cronica ipertrofizzante)  
enteropatia proteino-disperdente



# Sintomatologia

- Infezione:

- Asintomatico (>50%)  forma silente o frusta

- Sintomatico

- Fattori predisponenti  forma classica

- Età

- Infezioni/infestazioni concomitanti

- Momento produttivo

- Stress

- Stati carenziali

- acuta

- cronica

## Allevamento infetto

- Animali infetti e malati:

- Eliminatori continui

- Animali infetti e asintomatici:

- Eliminatori continui/saltuari

- Non eliminatori

- Animali non infetti

# Sintomatologia

## FORME CLINICHE

- **Decorso acuto (raro)**
  - **A seguito di un fattore debilitante**
  - **Anoressia, mancata ruminazione, sospensione produzione latte, dimagrimento rapido, edemi, diarrea tipica ad arco**
  - **Decorso di 3-5 gg mortale**

# Forme cliniche

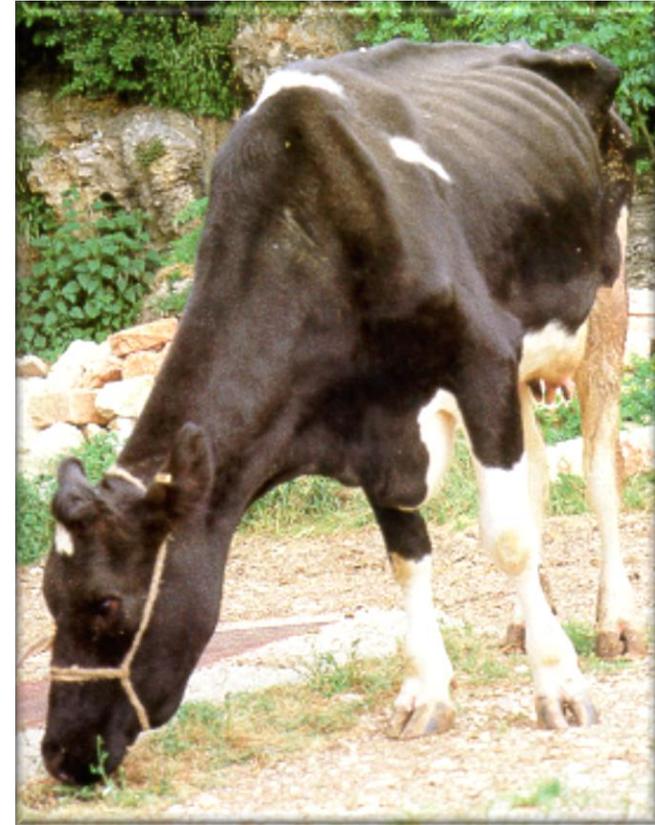
## - Decorso cronico

» Esordio subdolo: disoressia, riduzione produzione latte, dimagrimento progressivo, feci schiumose intermittenti

» La diarrea diventa liquida e continua, disidratazione e dimagrimento sempre più evidente

» Stadio finale: animale cachettico

» Decorso di mesi/anni mortale

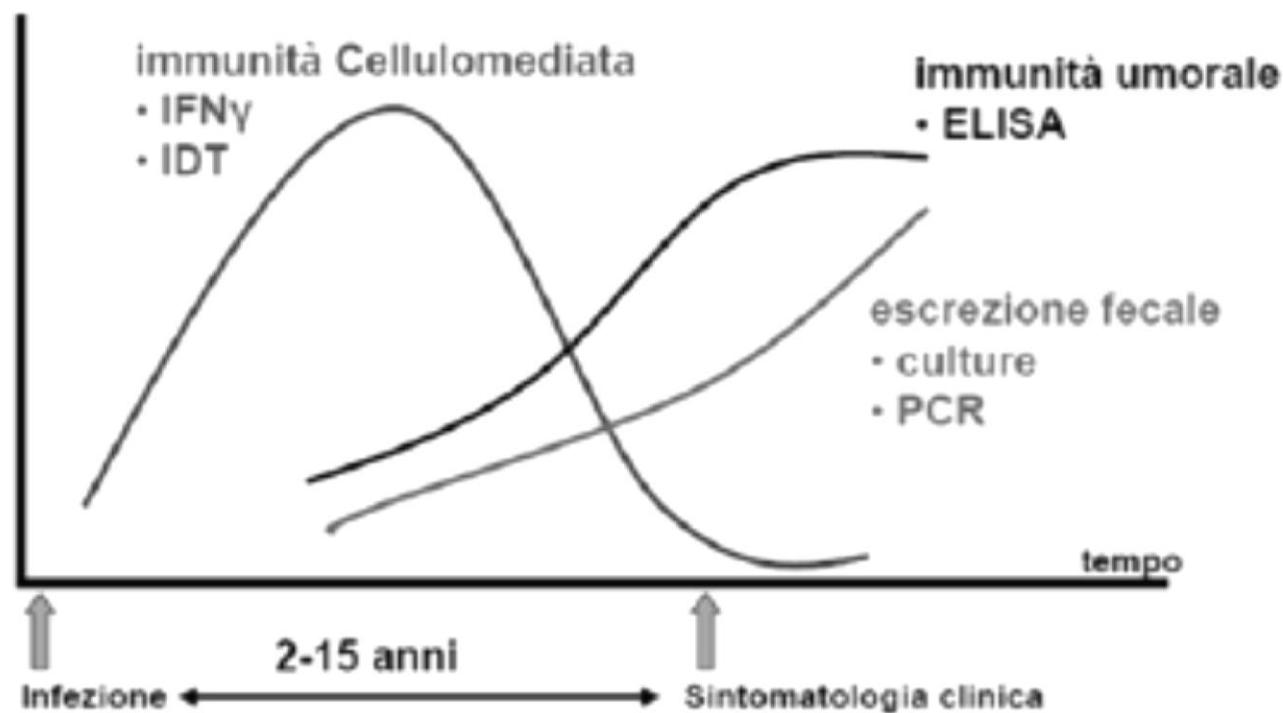


## • SILENTE O FRUSTA

– Sintomi generici (lieve dimagrimento e calo produzione latte)

# Paratuberculosis: periodo di incubazione

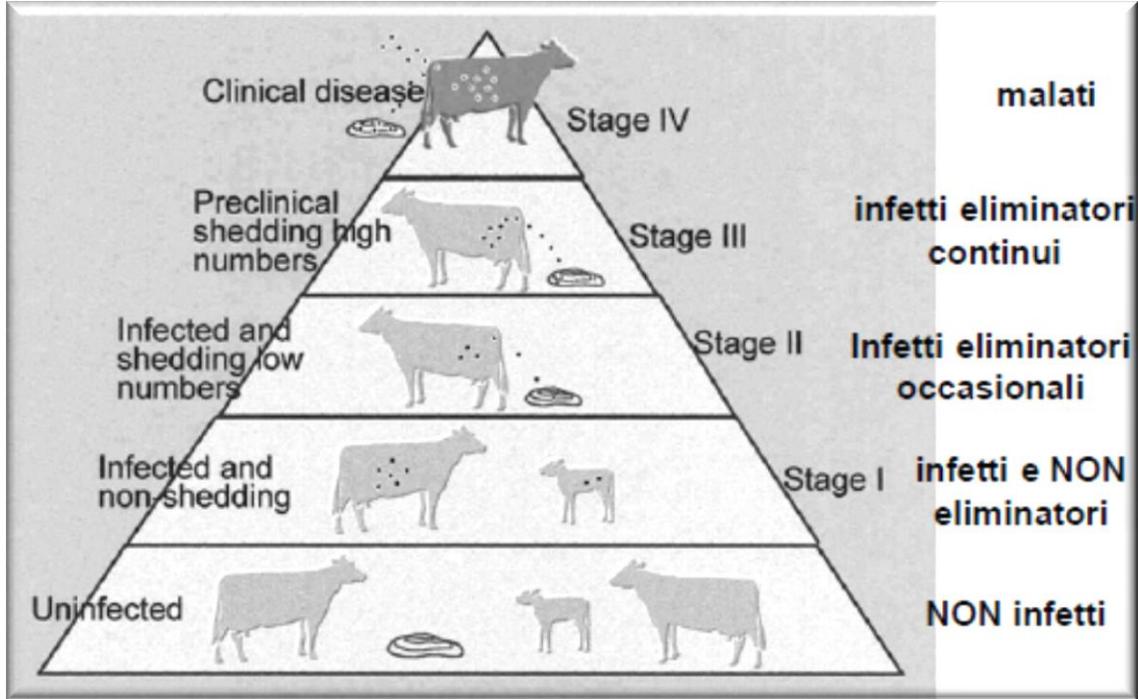
- da alcuni mesi fino a 5 anni
- generalmente i sintomi si evidenziano tra i 2 - 5 anni di età (1°- 2° parto)
- l'infezione non sempre esita nella malattia



alti  
escretori 19%

medi escretori 10%

bassi escretori 71%

















# **Paratuberculosis: impatto economico**

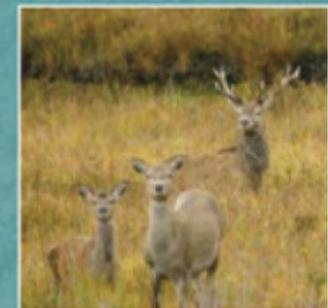
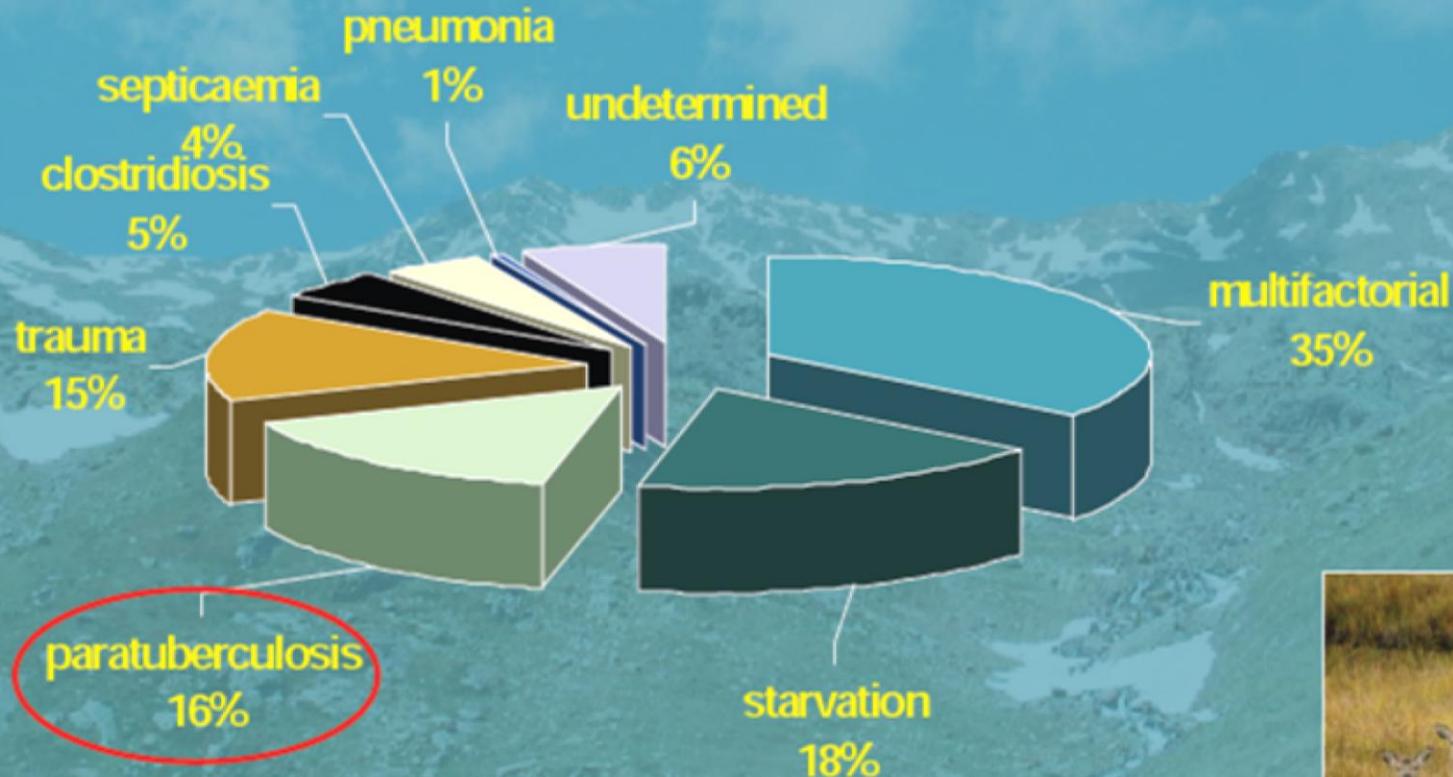
- Aumento necessità rimonta sia per comparsa di forme cliniche, sia per scarsa produttività degli animali**
- Ridotta efficienza alimentare di animali infetti**
- Riduzione produzione di latte da parte di vacche infette stimata tra 8% e 25%, anche già alla prima lattazione**
- Maggior predisposizione vacche infette a contrarre altre malattie**



INDAGINE IN CERVI (2004 – 2005) – P.P. A. A. TN e BZ –  
Fonte: IZS VE

SPECIE	%	analizzati
<i>Cervus elaphus</i>	40	630
<i>Capreolus capreolus</i>	15	487
<i>Rupicapra rupicapra</i>	14	194
<i>Vulpes vulpes</i>	9	157

# Cause di mortalità nel cervo



# Diagnosi

- **Problema: Identificare i portatori asintomatici**

## *IN VITA:*

- dati anamnestici
- segni clinici
- esami di laboratorio

## *POST MORTEM*

- reperti anatomopatologici e istologici
- esami di lab

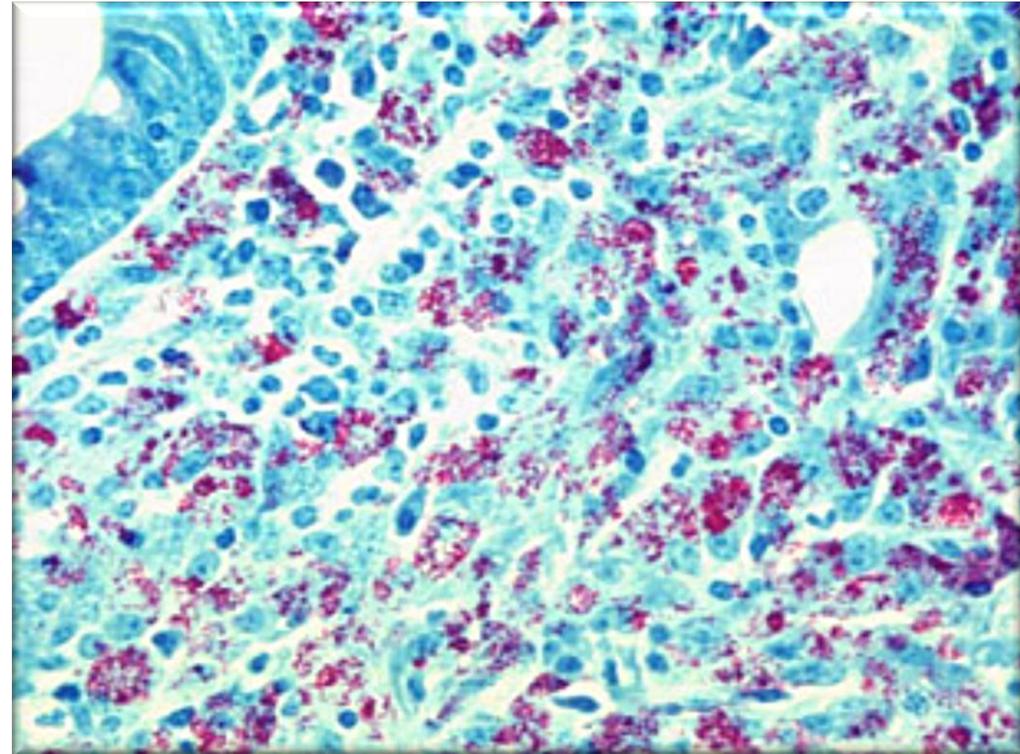
# Diagnosi

Esami collaterali di laboratorio ematologici e ematochimici:

- Anemia normocromica e normocitica
- Ipoprotidemia, ipoalbuminemia

# Diagnosi diretta

- **Esame microscopico**
  - Colorazione Ziehl-Neelsen (*M. avium* subsp. *paratuberculosis* forma aggregati, a differenza di altri micobatteri che tendono a restare isolati). Corti bacilli rosso vivo
  - Campioni: Feci; raschiato mucosa rettale; valvola ileocecale *postmortem*)
- **Immunoistochimica**
  - Campioni: sezioni di tessuto



# Diagnosi diretta

- **Esame batteriologico classico**
  - **Campioni:**
    - Feci (10 g, trattamento con NaOH e Ac. ossalico, conservare a 4°C); raschiato di mucosa rettale
    - Valvola ileocecocolica e linfonodo ileocecale
    - Biopsie
  - **Modalità**
    - Decontaminazione, aggiunta di micobattina e incubazione per 12 settimane a 37°C
    - Identificazione sierologica
  - **Risultato negativo:**
    - Dopo 2-3 rilevamenti – di tamponi rettali su tutti gli animali a distanza di 6 mesi

**Limite rilevabilità: 1 u.f.c./m**

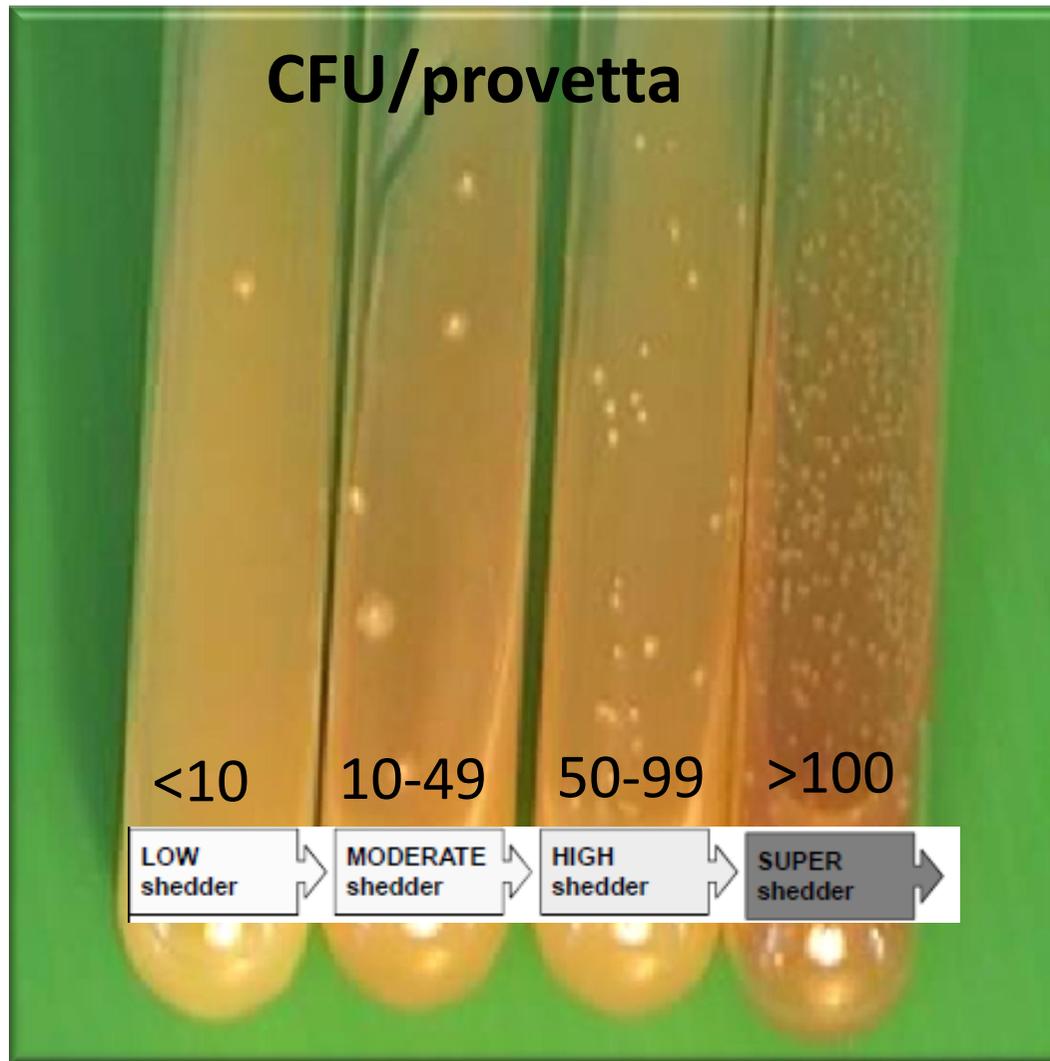
# Diagnosi diretta

**Risultati:** qualitativi o semi-quantitativi

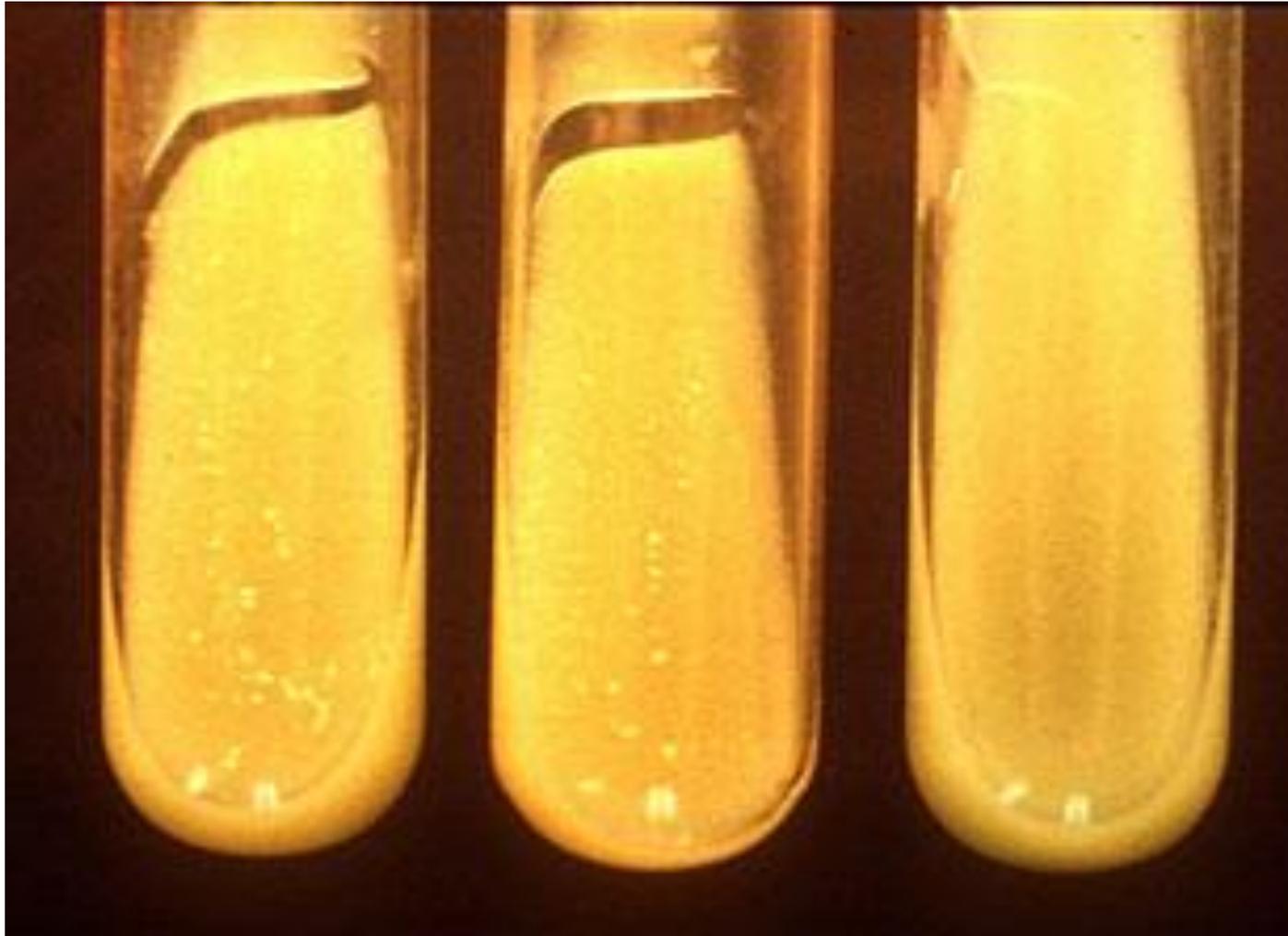
**Vantaggi:** massima sensibilità tra i test disponibili (gold standard), non necessita di attrezzature particolari

**Svantaggi:**

- lunghi tempi di incubazione (4-16 sett.), media 12 sett.)
- costi elevati
- poco standardizzata (personale, terreno)
- inquinamento colture
- sensibilità ( $\pm 50\%$ ) comunque scarsa



Una bovina super shedder subclinica elimina da  $10^4$  a  $10^6$  CFU/g di feci



**Crescita di *M. avium subsp. paratuberculosis* a 14 settimane in Herrold's agar con Mycobactin (2 tubi a sx); assenza di crescita in assenza di Mycobactin (dx)**

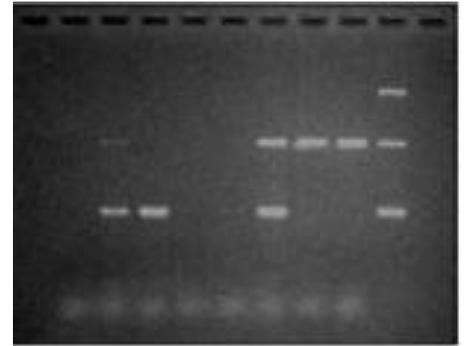
# Diagnosi diretta

- Altre metodiche di isolamento
  - sistema BACTEC
    - terreno liquido che contiene una fonte di nutrimento marcata con  $^{14}\text{C}$
    - vantaggi
      - maggiore sensibilità
      - tempo più breve di incubazione (7 settimane)
    - svantaggi
      - costo elevato
      - utilizzo di materiale radioattivo
  - MGIT (Mycobacteria Growth Indicator Tube)
    - terreno liquido contenente un sistema di rilievo della crescita di *M. avium subsp. paratuberculosis* non radiometrico (fluorescence quenching based oxygen sensor)
    - il sistema automatizzato consente di identificare la crescita in 7 giorni

# Diagnosi diretta

## – PCR

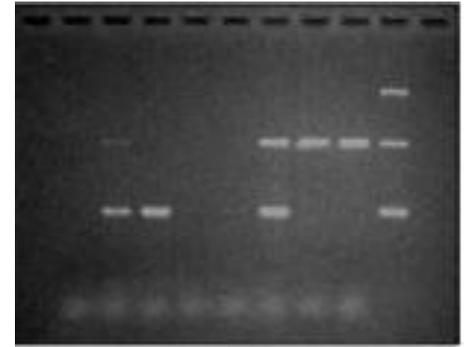
- **sequenza di elezione, specifica IS 900**
  - ripetuta per circa 18 volte
- **campioni**
  - Feci, sangue, tessuto, latte, seme
- **esito in 24-48 hrs**
- **non risente di eventuali inquinamenti**
- **evidenzia anche ceppi non coltivabili**



# Diagnosi diretta - PCR

## falsi negativi:

- inibitori
- limite rilevabilità:  $10^2$  -  $10^4$  u.f.c./m



## falsi positivi:

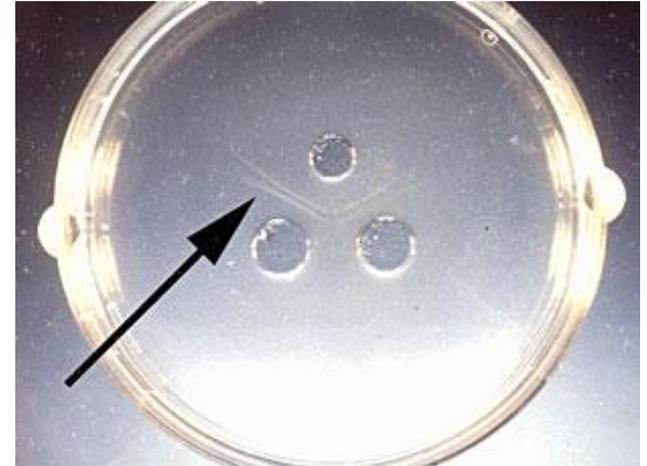
- contaminazione
- sequenze IS900-like in batteri diversi da Map

**utilizzo:** conferma dei ceppi isolati in coltura; conferma delle lesioni anatomico-patologiche; conferma sospetto clinico; compravendita / esportazioni

# Diagnosi sierologica

## – AGID:

- Bassa sensibilità preclinica (solo grave forma clinica)
- Buona specificità
- Rapido, economico
- Risultato qualitativo
- Conferma sospetto clinico



## – ELISA (test di elezione):

- Su sangue e su latte
- Insoddisfacente sensibilità preclinica
- Buona specificità
- Rapido, economico
- Risultato qualitativo/quantitativo
- Conferma sospetto clinico, risanamento di un allevamento, compravendita, esportazione

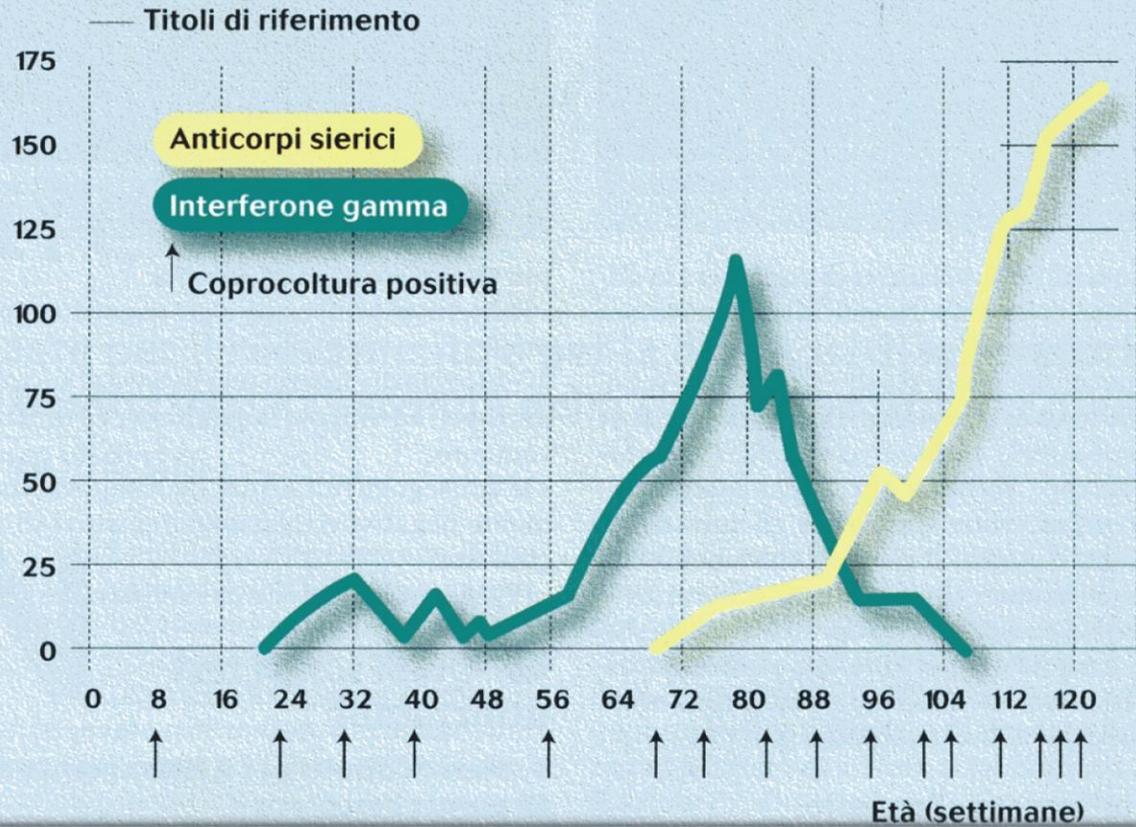
# Diagnosi indiretta

## –diagnosi *in vitro*

- test del  $\gamma$ -IFN

- individua animali infetti prima che inizi l'eliminazione dell'agente
- problemi cross-reattività con micobatteri ambientali

## Risposte caratteristiche ai test diagnostici per la paratubercolosi, negli animali infetti in fase precoce



# Sensibilità di alcuni metodi diagnostici misurata su 142 bovini con paratubercolosi subclinica

## Metodi colturali

Standard 42%

BACTEC 51%

## Metodi sierologici

AGID 27%

ELISA 42% - 46%

Informazioni	Test	Età degli animali
Screening di allevamento	ELISA	> 36 mesi
Piano di controllo/monitoraggio su animali adulti	ELISA	> 24 mesi
Piano di controllo/monitoraggio su animali giovani	IFN- $\gamma$	< 12 mesi
Conferma caso clinico	PCR+ELISA	Animali clinici
Dimostrazione agente-eziologico	Esame colturale/PCR	Animale sieropositivo

# Diagnosi anatomo/istopatologica

- **Lesioni macroscopiche**

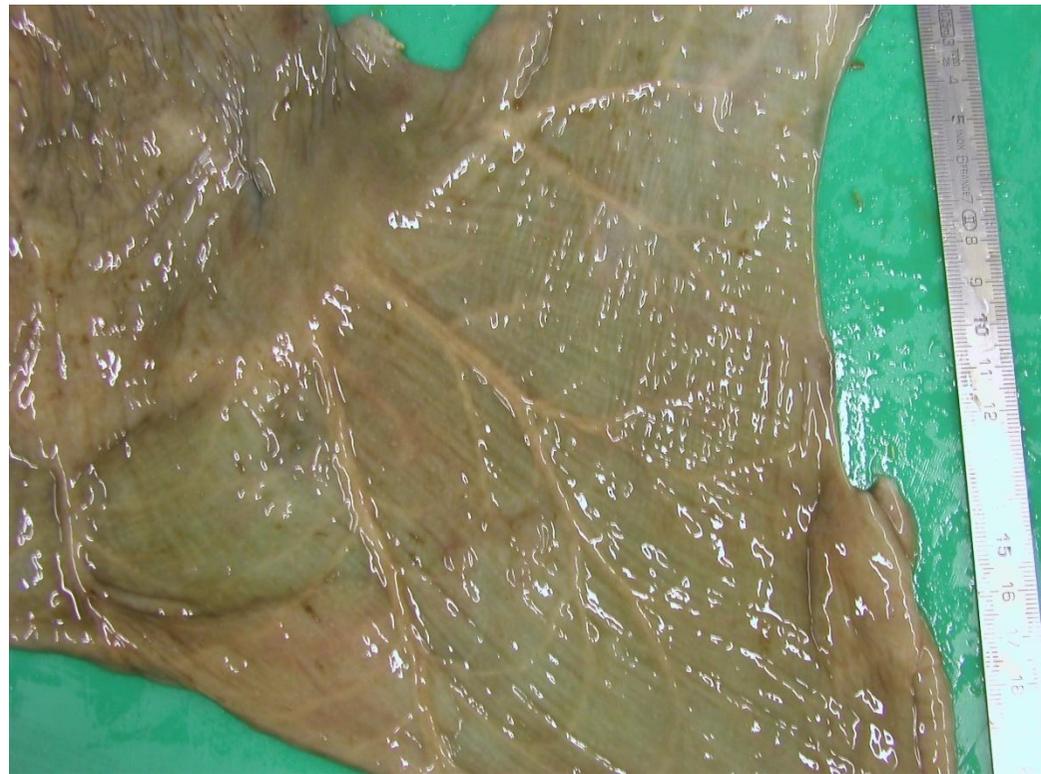
- Non proporzionale a gravità sintomi, a volte assenti
- Tipiche:
  - Emaciazione
  - Edema mucosa intestinale: intestino a scala di corda (pliche longitudinali e trasversali) nella fase terminale
  - Linfonodi mesenterici aumentati di volume: liquido citrino al taglio

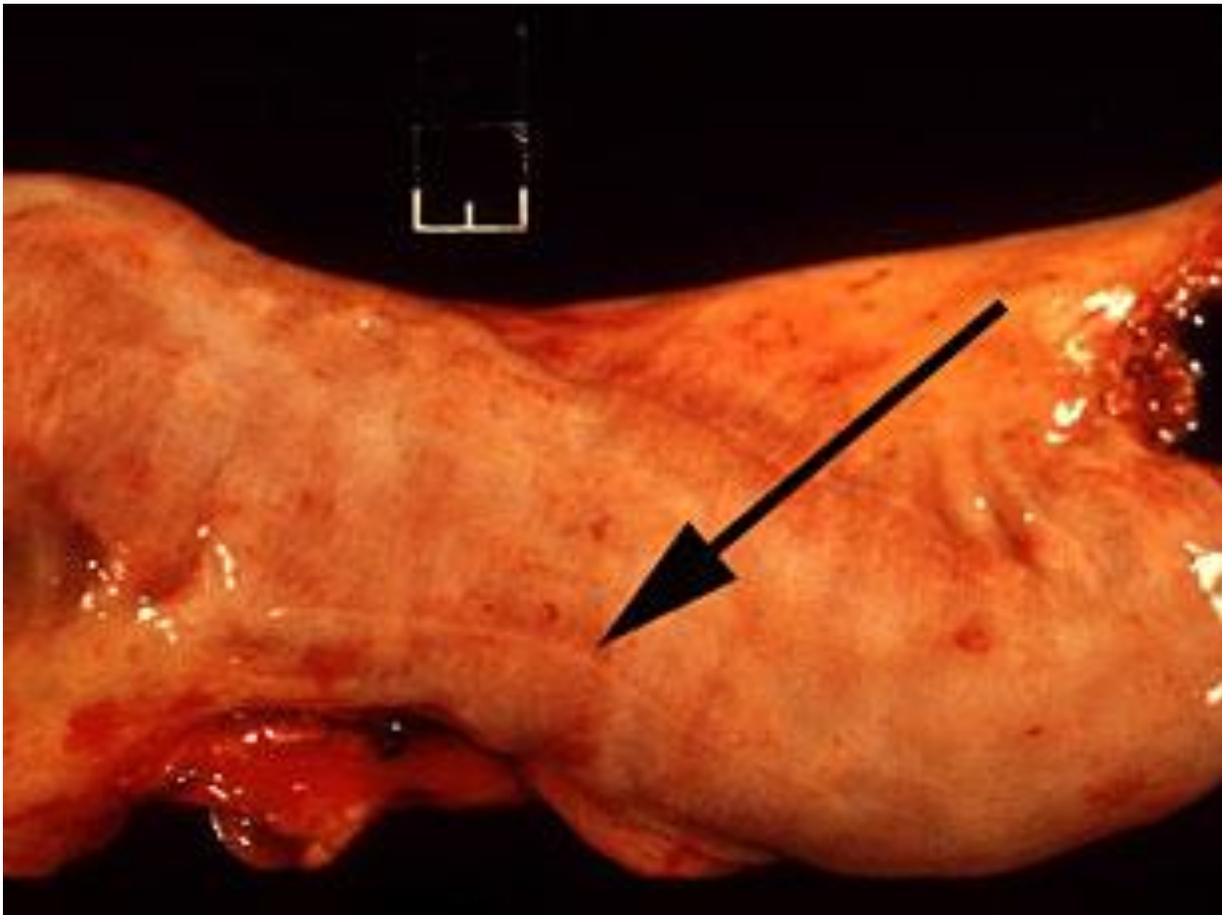
- **Lesioni istopatologiche**

- Lievi, moderate o gravi
  - macrofagi e cellule di Langhans a livello dei villi intestinali, sottomucosa intestinale o nella zona paracorticale dei linfonodi mesenterici
  - il processo infiltrativo si blocca a livello di valvola ileocecale

Ispessimento dei linfatici  
della sottosierosa





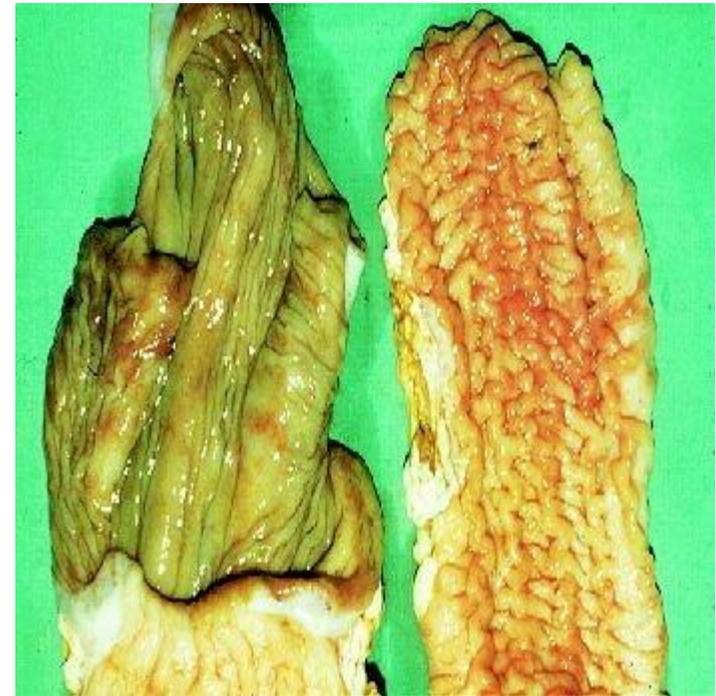


Inflammation e dilatazione dei vasi linfatici sulla superficie dell'ileo

Ispessimento dell'ileo causato dalla risposta infiammatoria alla infezione da *M. avium* subsp. *Paratuberculosis*

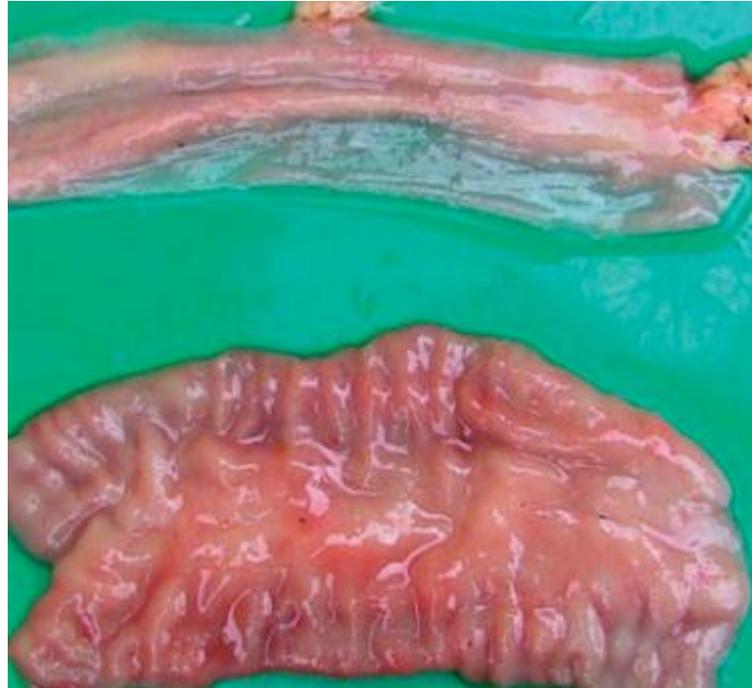


Ileo normale →



# Pecora

Ileo normale



paratuberculosis

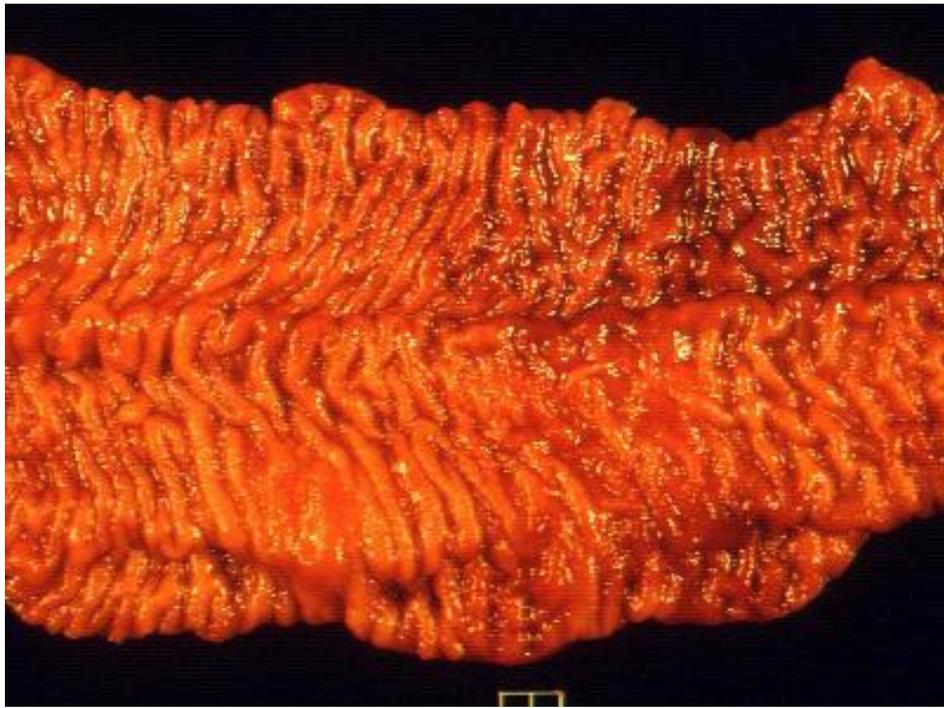




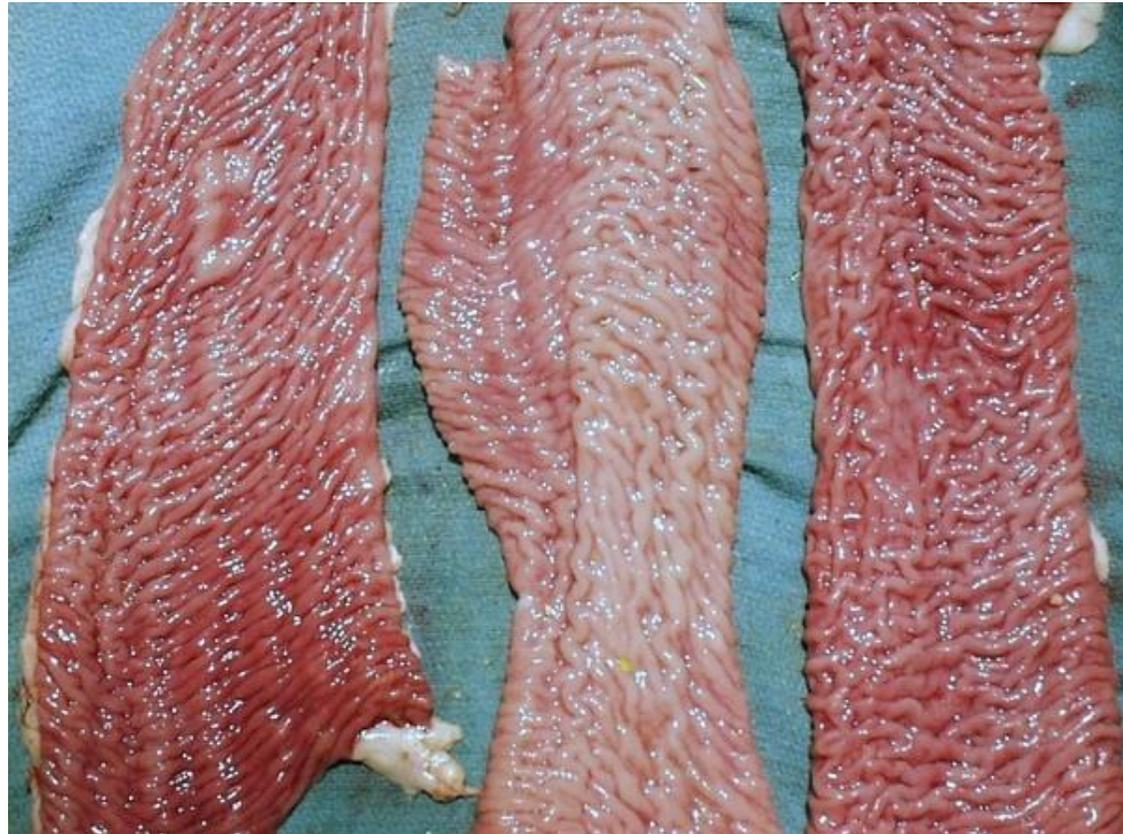


Tenue di bovino: enterite granulomatosa: ispessimento della mucosa con pieghe trasversali prominenti





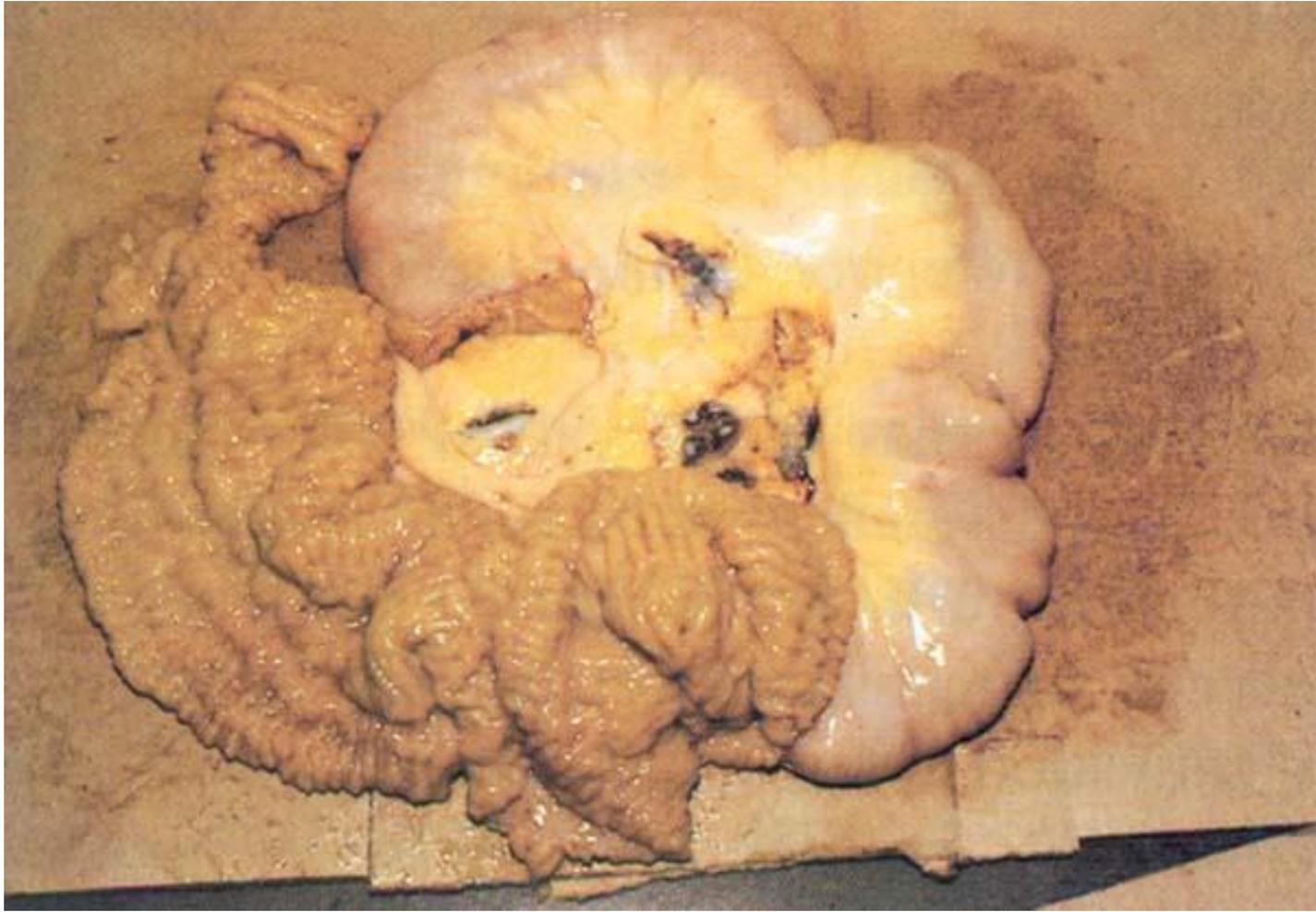
Mucosa di ileo di bovino ispessita per infiammazione granulomatosa cronica













# Profilassi diretta

- Modifiche nella conduzione dell'allevamento
- Identificazione ed eliminazione dei soggetti infetti
- Controllo animali da rimonta

# Profilassi diretta

## Conduzione allevamento

- Interruzione del ciclo oro-fecale
  - Miglioramento standard igienico
    - “sala parto” igienicamente idonea, lavaggi, disinfezioni
    - separazione madre – vitello, alimentazione artificiale
    - evitare contaminazione fecale di colostro e latte per i vitelli
    - separazione individuale dei vitelli 1° mese, di gruppo 1° anno
    - cura vitelli prima di quella degli adulti, con uso di strumenti e calzature diversi
    - controllo contaminazione fecale acqua di abbeverata
    - recinzione pascoli; non spargere letame non maturo sul pascolo
    - eliminazione di acque stagnanti

# Rischio di trasmissione MAP in allevamento: cosa valutare

## **Sala parto**

Presenza contemporanea di più animali  
Utilizzo anche come infermeria  
Livello igienico

## **Vitelli pre-svezzamento**

Somministrazione colostro e latte di vacche infette  
Contatto diretto o indiretto con adulti  
Contaminazione alimento e acqua con feci di animali adulti

## **Vitelle svezzate/manzette/manze gravide/vacche**

Contatto diretto con animali adulti e loro deiezioni  
Contaminazione fecale alimenti/mangiate e acqua/abbeveratoi  
Pascolo promiscuo con animali adulti  
Accesso a zone di accumulo/stoccaggio di letame/liquami  
Alimentazione con foraggi su cui è stato spanto letame/liquame infetto

# Profilassi diretta

## **Animali infetti**

- Identificazione di animali infetti:
  - Esame di sangue e feci di soggetti con sintomatologia enterica
  - Controlli periodici degli animali > 2 anni
  
- Eliminazione di tutti gli infetti
  - anche dei vitelli negativi nati da madri infette

# Profilassi diretta

## **Controllo animali da rimonta**

- Solo da allevamenti “sicuramente” negativi (non esiste attualmente certificazione ufficiale)
- Prima dell’acquisto sottoporre a prove diagnostiche, sia sierologiche che batteriologiche

# Computer simulation of different Johne's control programs

