

PARATUBERCOLOSI

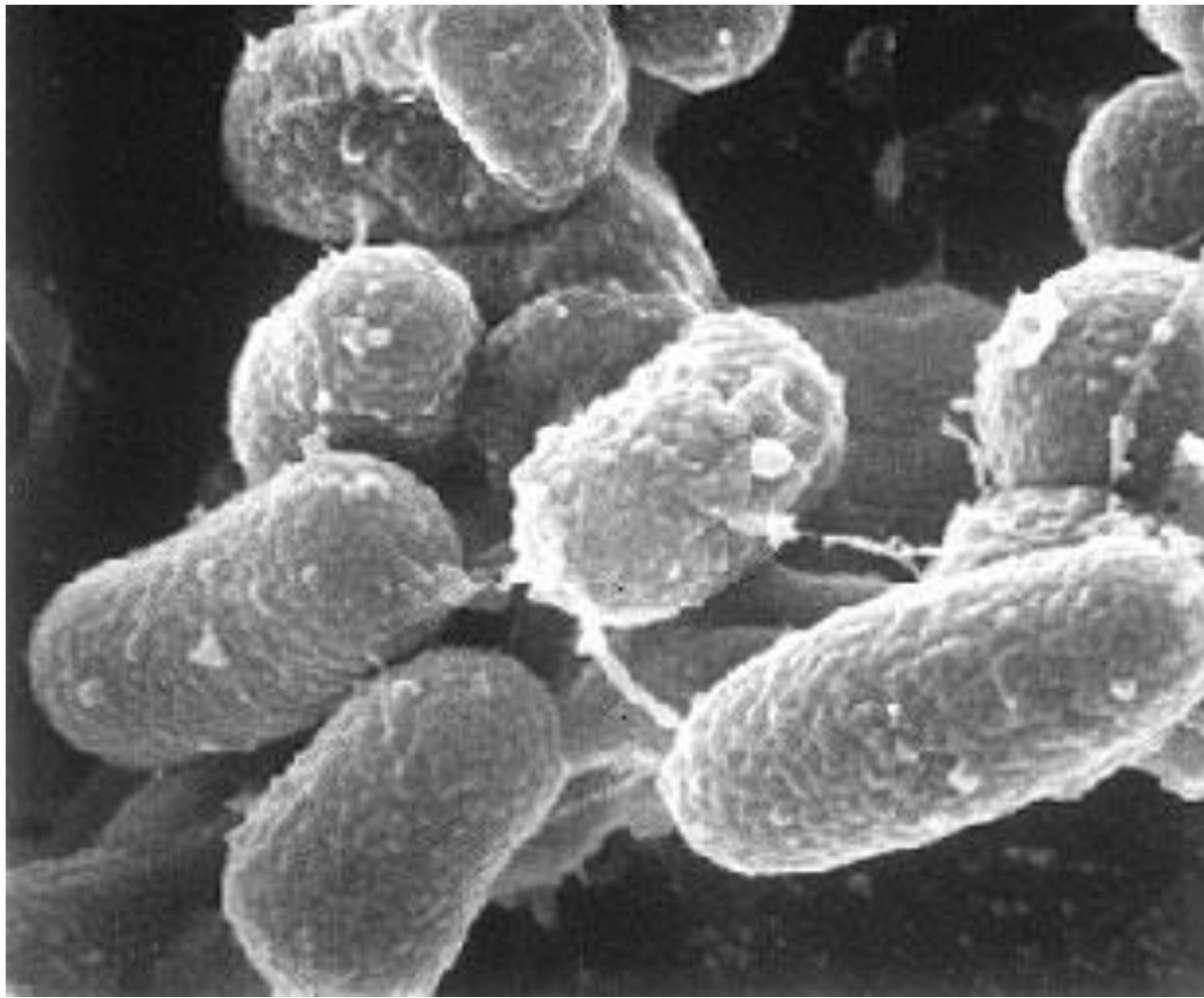
Malattia di Johne

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 μm * 0,5 μm
 - 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 log₁₀ (cellule libere)
- riduzione di 0.16-0.94 log₁₀ (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	Pouqaler ELISA	All	8,793	292	3.3
Germany/Saxony	2002–2004	HerdChek, IDEXX, Würzburg, Germany	?	3,454	151	4.4
Germany/Arnberg	1993	ELISA, in-house	Cull cattle >18 months	536	79	15
Germany/Arnberg	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	Pouqaler 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	Pouqaler 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	1663	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 5Summary 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 [†]
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⁺, number of test-positive herds; HAP, herd level apparent prevalence; NA, not applicable.

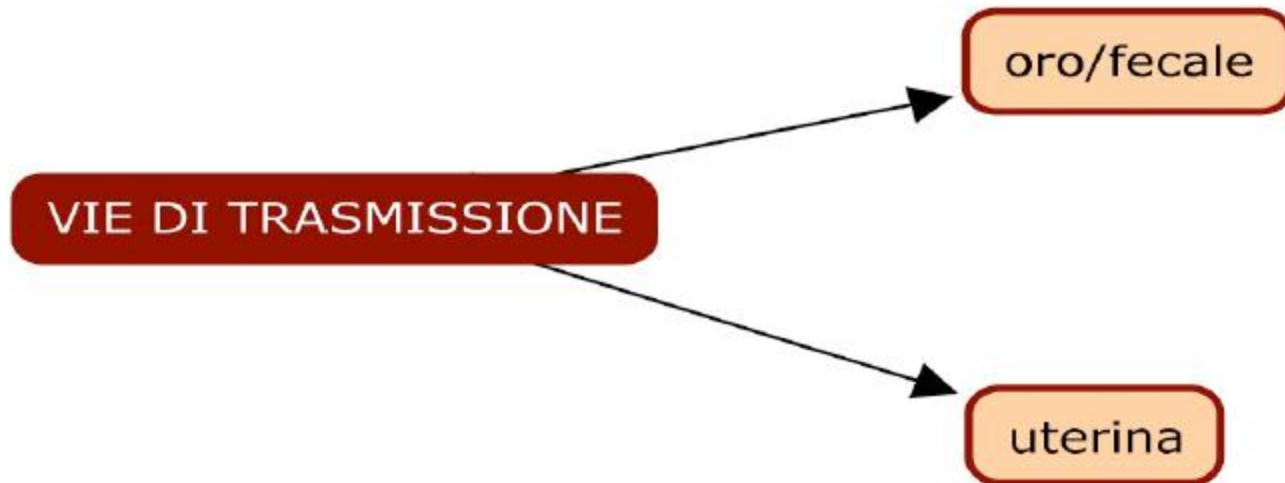
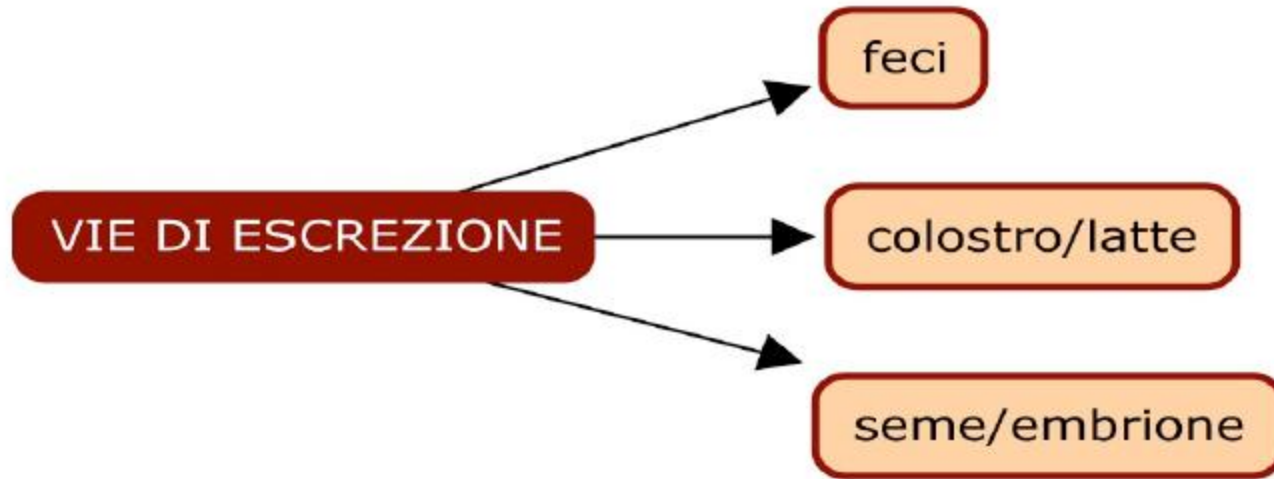
Epidemiologia

- 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

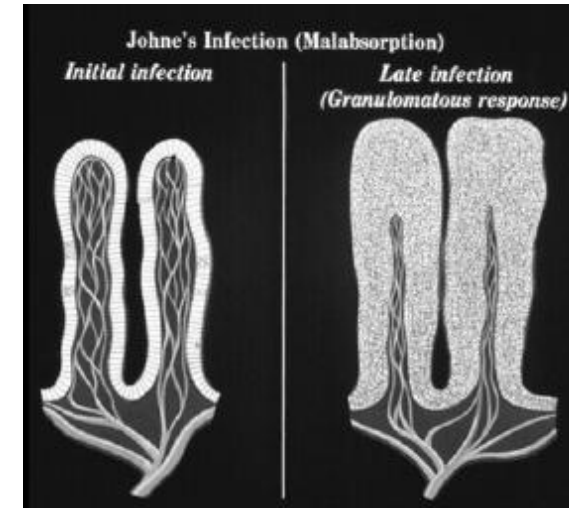


MACROFAGI

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

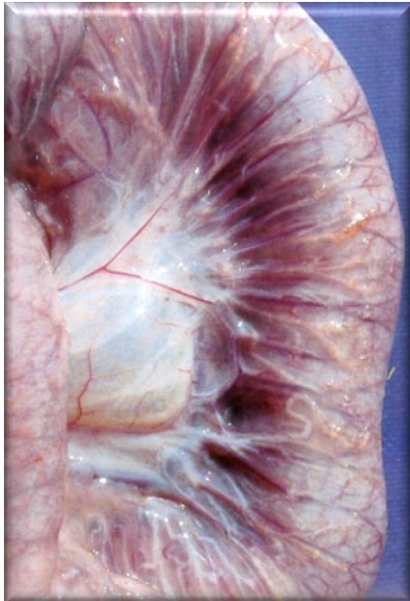


Patogenesi



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

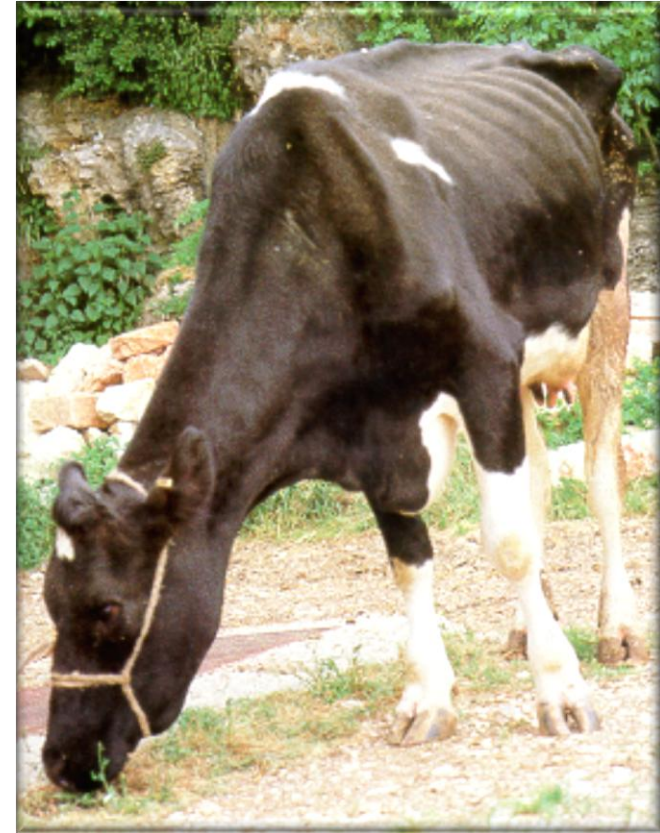
- Decorso cronico

» 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

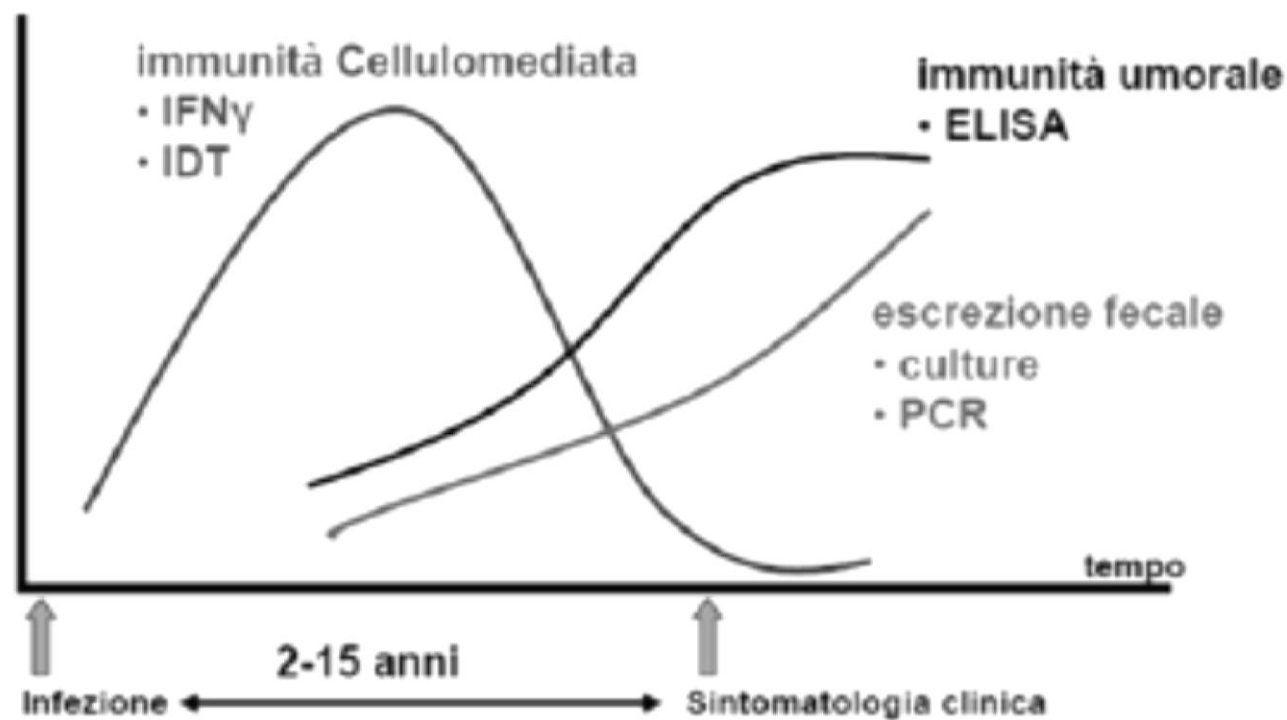


• SILENTE O FRUSTA

– Sintomi generici (lieve dimagrimento e calo produzione latte)

Paratuberculosis: periodo di incubazione

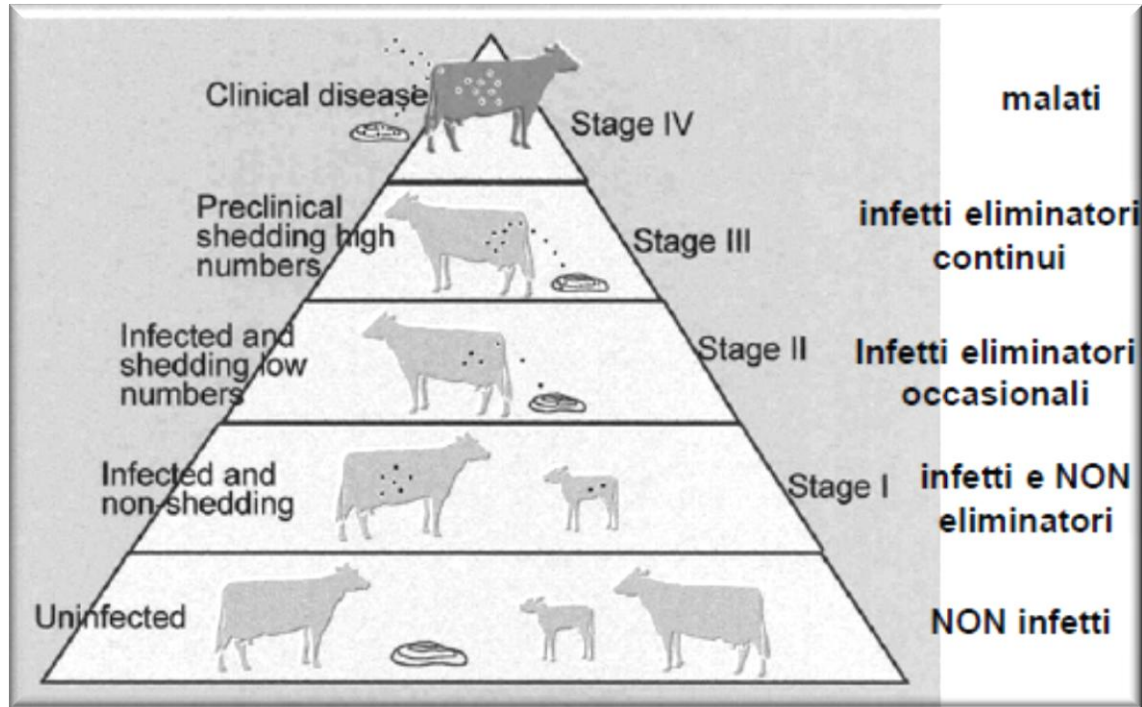
- da alcuni mesi fino a 5 anni
- generalmente i sintomi si evidenziano tra i 2 - 5 anni di età (1°- 2° parto)
- l'infezione non sempre esita nella malattia



alti
escretori 19%

medi escretori 10%

bassi escretori 71%

















Paratuberculosis: impatto economico

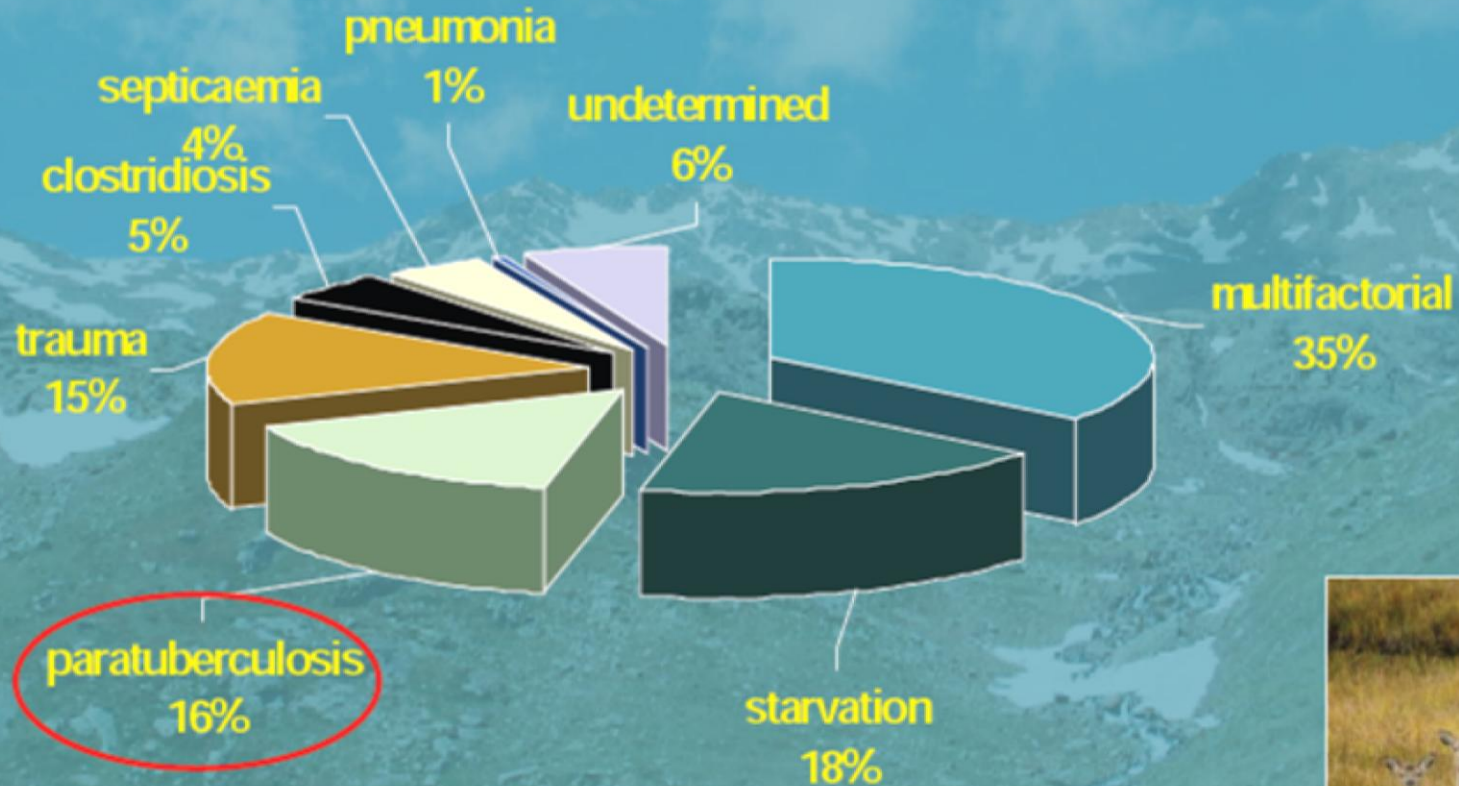
- Aumento necessità rimonta sia per comparsa di forme cliniche, sia per scarsa produttività degli animali**
- Ridotta efficienza alimentare di animali infetti**
- Riduzione produzione di latte da parte di vacche infette stimata tra 8% e 25%, anche già alla prima lattazione**
- Maggior predisposizione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

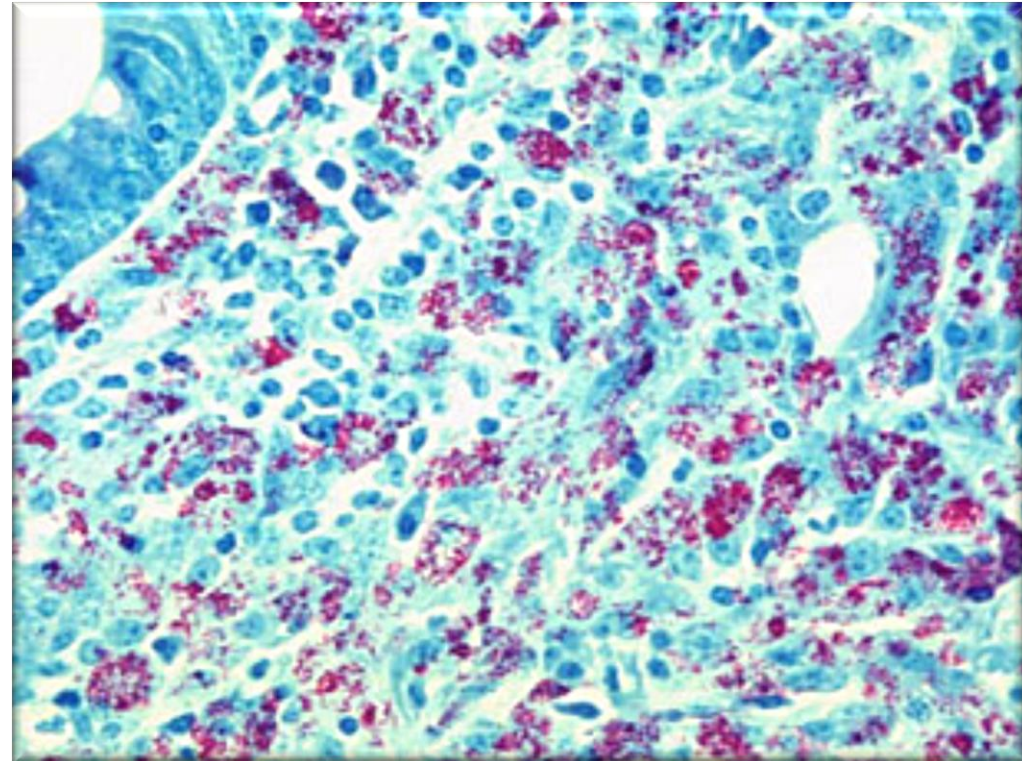
Diagnosi

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

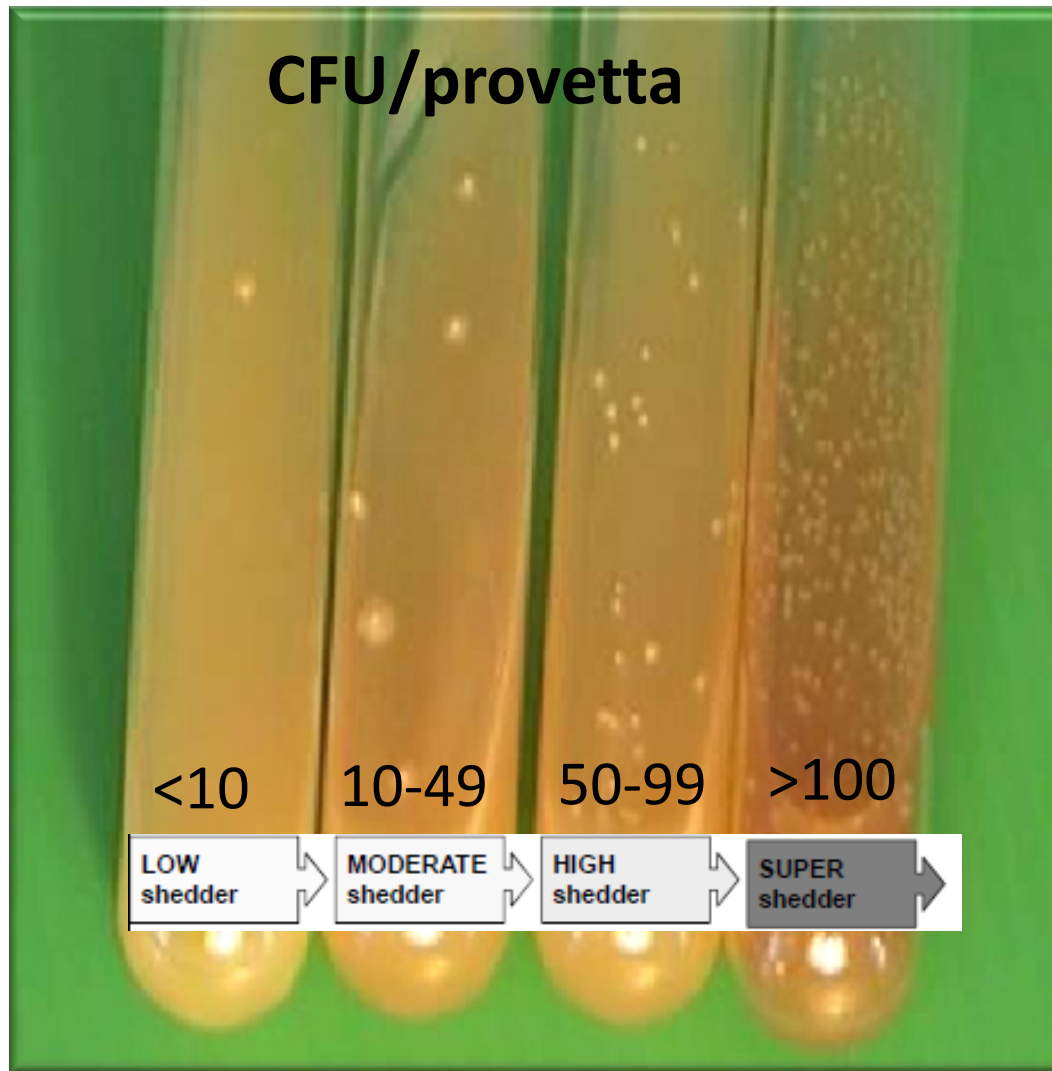
Diagnosi diretta

Risultati: qualitativi o semi-quantitativi

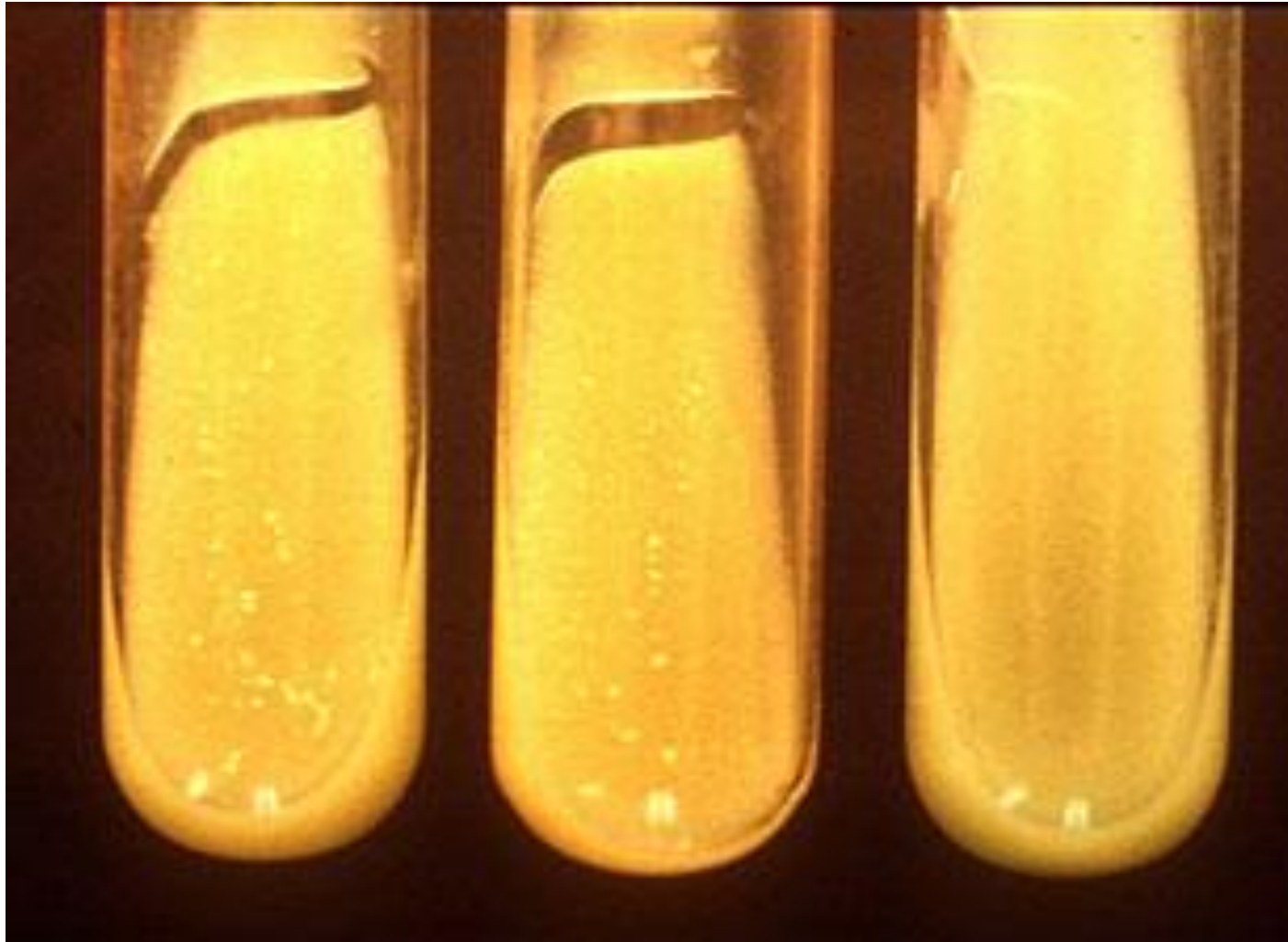
Vantaggi: massima sensibilità tra i test disponibili (gold standard), non necessita di attrezzature particolari

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)

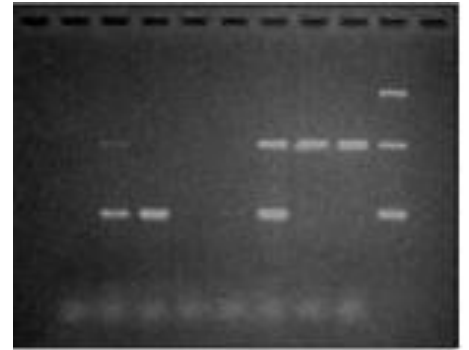
Diagnosi diretta

- Altre metodiche di isolamento
 - sistema BACTEC
 - terreno liquido che contiene una fonte di nutrimento marcata con ^{14}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

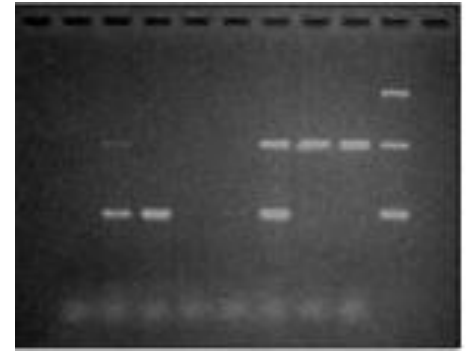
- **sequenza di elezione, specifica IS 900**
 - ripetuta per circa 18 volte
- **campioni**
 - Feci, sangue, tessuto, latte, seme
- **esito in 24-48 hrs**
- **non risente di eventuali inquinamenti**
- **evidenzia anche ceppi non coltivabili**



Diagnosi diretta - PCR

falsi negativi:

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



falsi positivi:

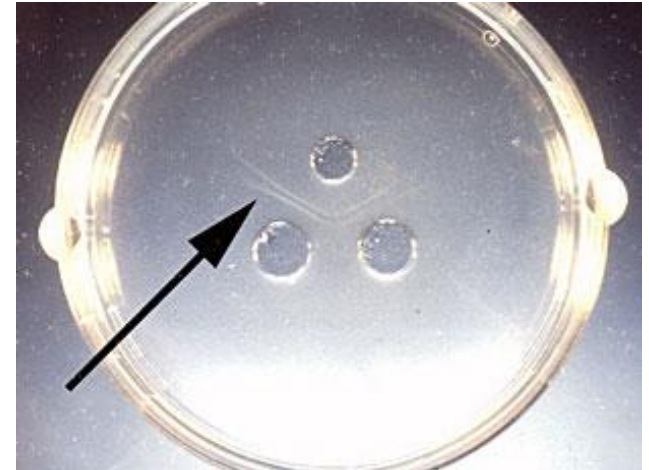
- contaminazione
- sequenze IS900-like in batteri diversi da Map

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

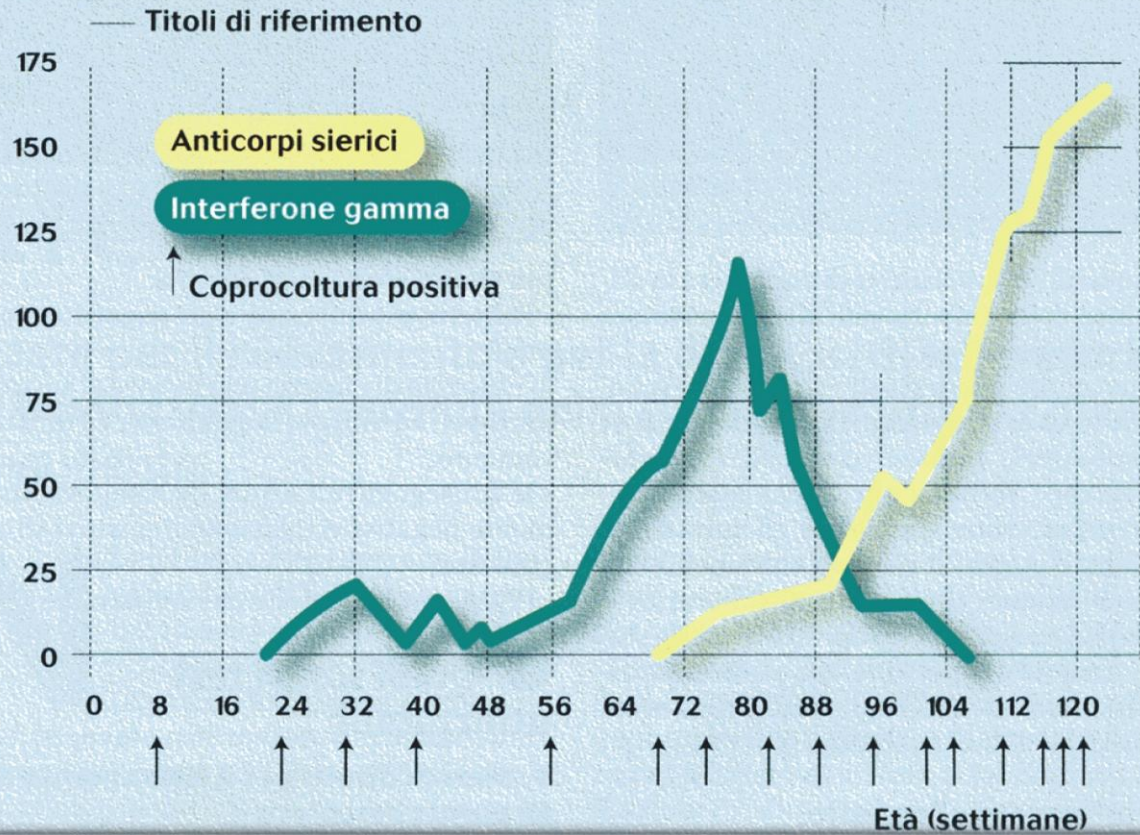
Diagnosi indiretta

–diagnosi *in vitro*

- test del γ -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- γ	< 12 mesi
Conferma caso clinico	PCR+ELISA	Animali clinici
Dimostrazione agente-eziologico	Esame colturale/PCR	Animale sieropositivo

Diagnosi anatomo/istopatologica

- **Lesioni macroscopiche**

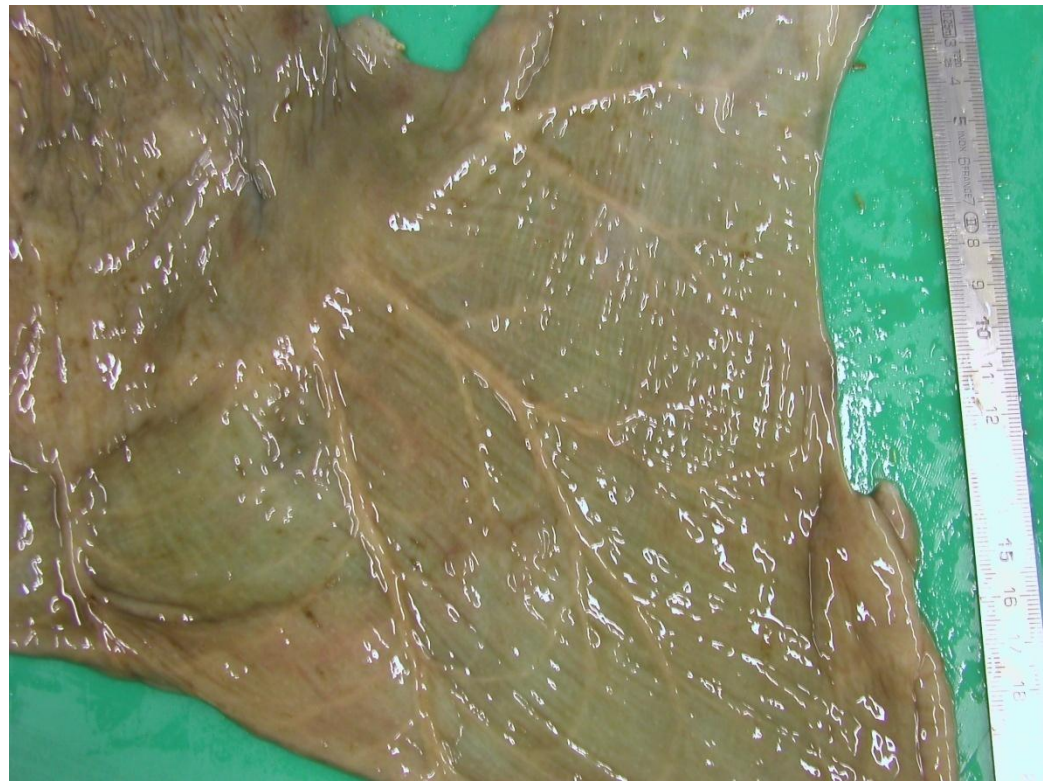
- Non proporzionale a gravità sintomi, a volte assenti
- Tipiche:
 - Emaciazione
 - Edema mucosa intestinale: intestino a scala di corda (pliche longitudinali e trasversali) nella fase terminale
 - Linfonodi mesenterici aumentati di volume: liquido citrino al taglio

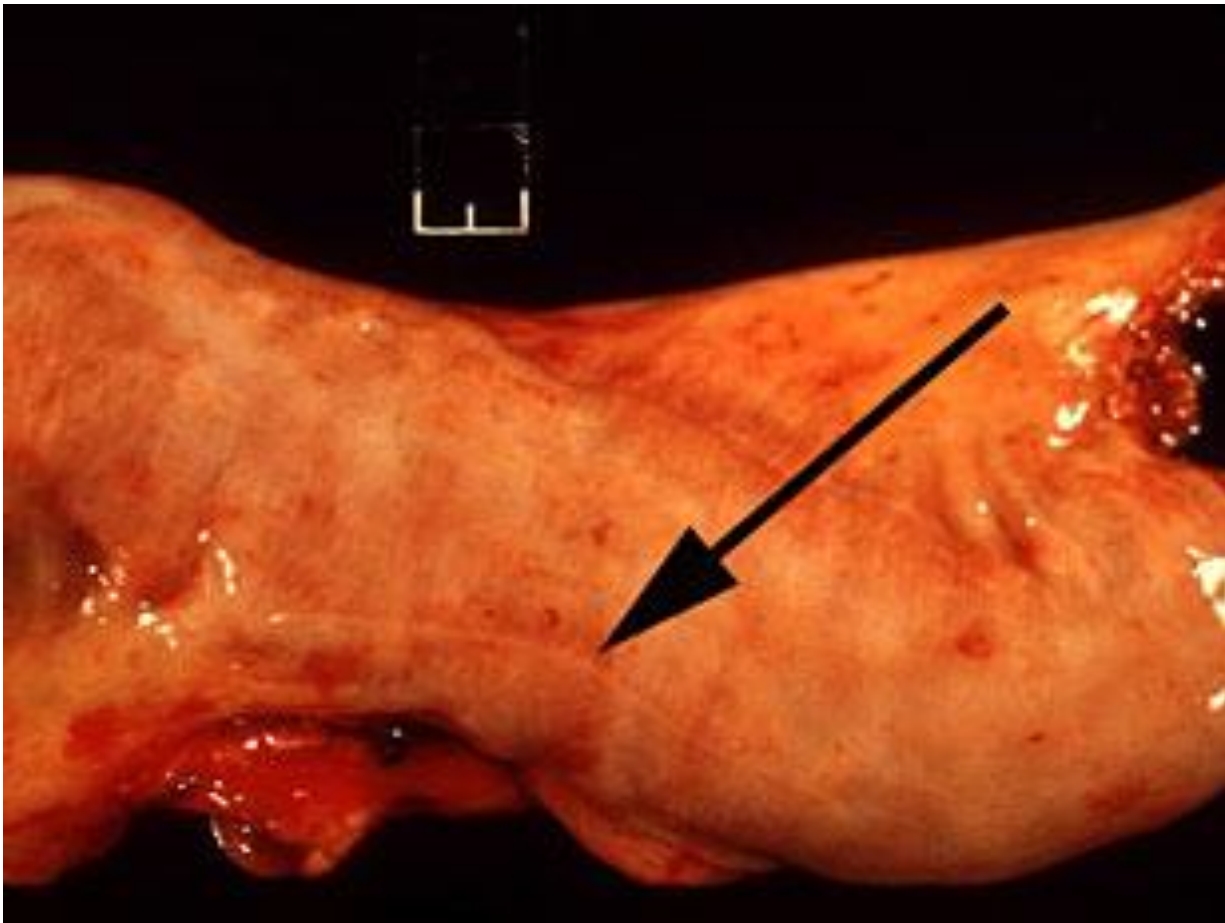
- **Lesioni istopatologiche**

- 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





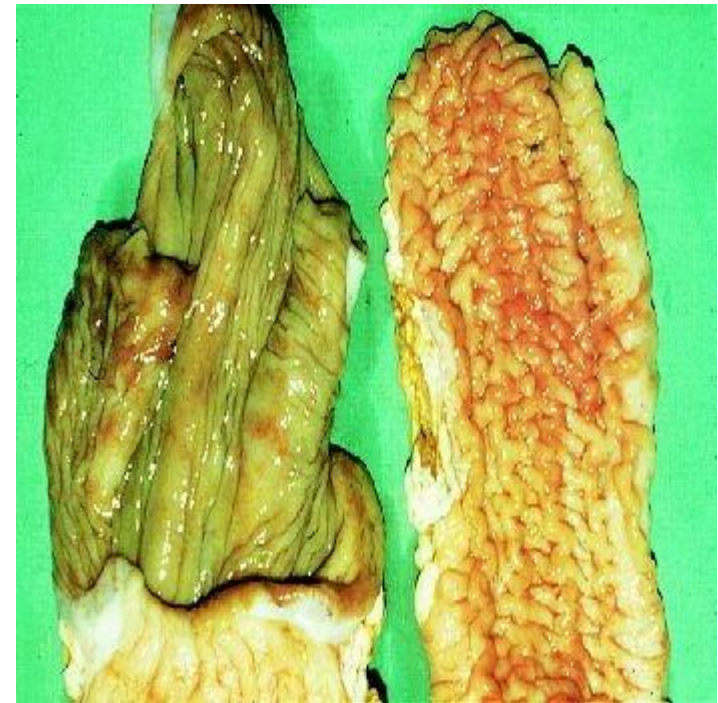


Inflammation e dilatazione dei vasi linfatici sulla superficie dell'ileo

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



Ileo normale →



Pecora

Ileo normale



paratuberculosis





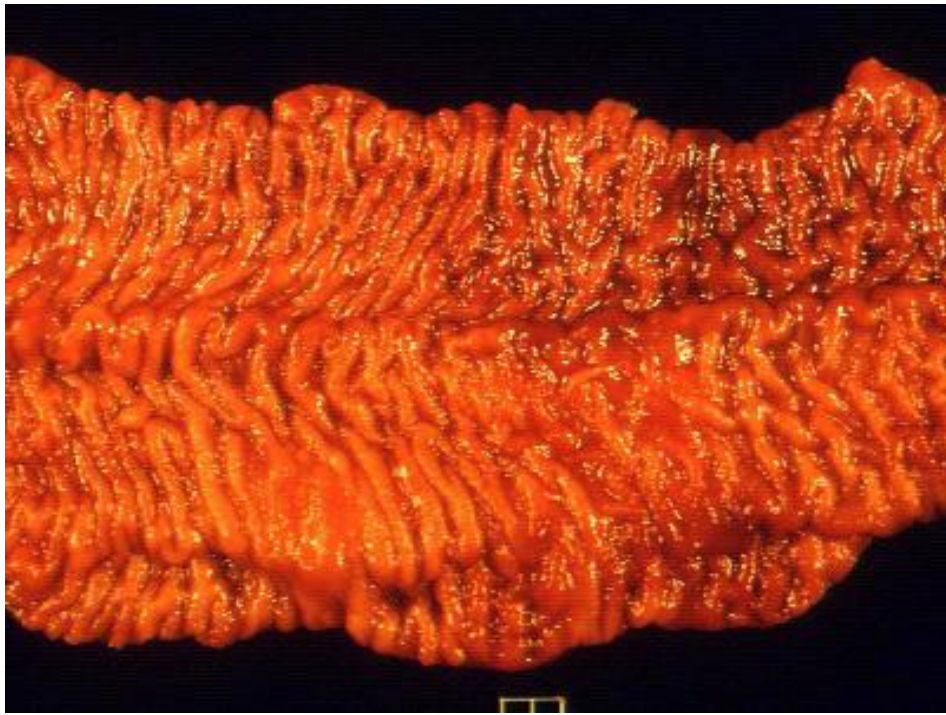


Tenue di bovino: enterite granulomatosa: ispessimento della mucosa con pieghe trasversali prominenti



2582111
S1407





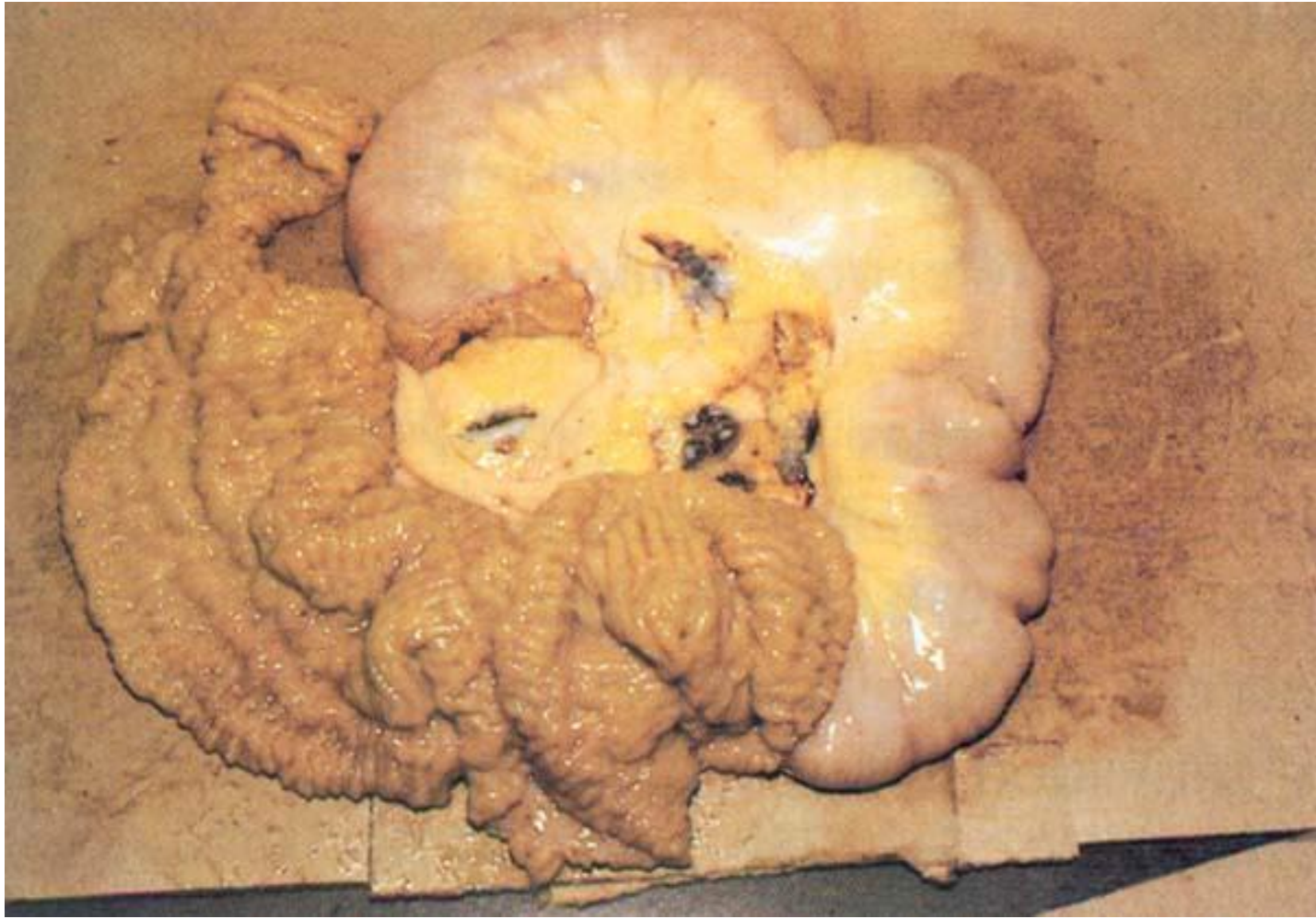
Mucosa di ileo di bovino ispessita per infiammazione granulomatosa cronica











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

