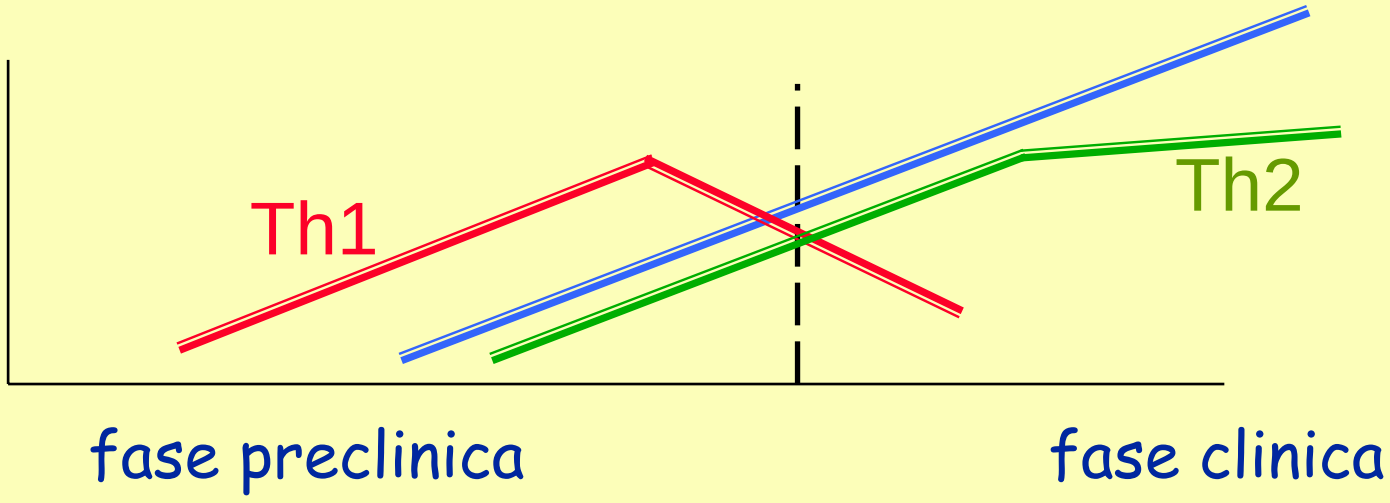
Roma, 29 maggio 2008
"La diagnostica di laboratorio in sanità animale"

Paratubercolosi: diagnosi di laboratorio

Norma Arrigoni
Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna
Centro di Referenza Nazionale per la Paratubercolosi – Sezione di Piacenza

CINETICA DELLA RISPOSTA IMMUNITARIA NEI CONFRONTI DELL'ESCREZIONE FECALE



IMMUNITA' CELLULOMEDIATA (protettiva)

ESCREZIONE FECALE

IMMUNITA' UMORALE (non protettiva)

DIAGNOSI: I TEST DISPONIBILI

DIAGNOSI DIRETTA

- **Esame microscopico**
  (coloraz.Ziehl- Neelsen)

- **Coltura:**
  - **Metodi tradizionali**
  - **Metodi radiometrici**
  - **Metodi fluorimetrici**

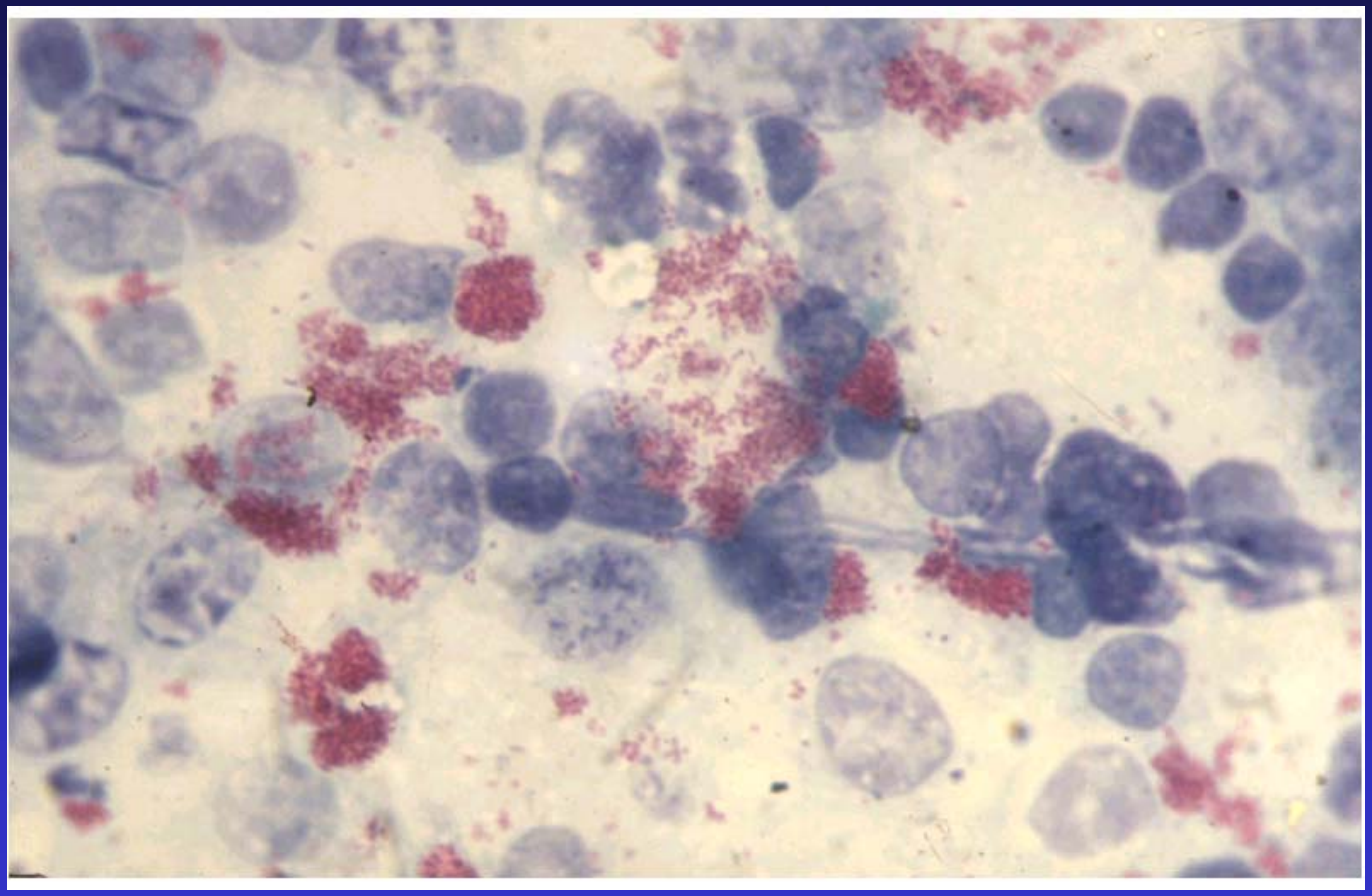
- **PCR**

DIAGNOSI INDIRETTA

- **Immunità Umorale:**
  - **ELISA**
  - **AGID**
  - **FdC**

- **Immunità cellulo-mediata**
  - **ID**
  - **γ IFN**

ESAME MICROSCOPICO (Ziehl-Neelsen)



ESAME MICROSCOPICO (Ziehl-Neelsen)

- **PRELIEVI :** feci o organi
- **RISULTATI :** qualitativi (+ / -)
- **VANTAGGI :** rapido
  economico
  semplice
- **SVANTAGGI :** falsi - (soglia sensibilità 10^5 - 10^6 /gr.)
  falsi +

DA RISERVARE AI CASI CLINICI
(confermare con test sierologico, colturale, PCR)

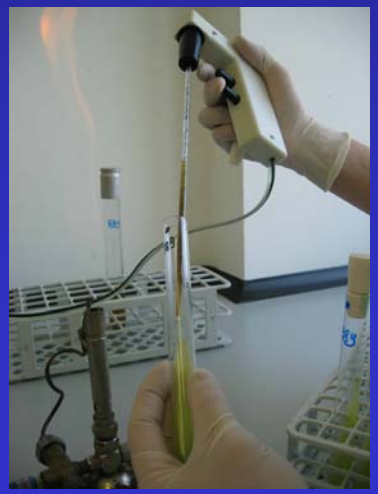
ESAME COLTURALE
(tecnica per sedimentazione)

10 g di feci in
100 ml HPC 0,75%

Agitare per 30’

Lasciare sedimentare 5’ e
prelevare surnatante

Lasciare
sedimentare
overnight



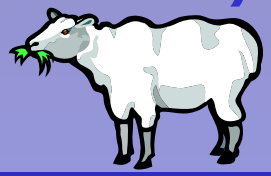
Seminare 0,2 ml
di sedimento in
4 provette (2 HEYMP-
ANV e 2 HEYM-CAF)
e incubare a 37 °C
per 4 -16 settimane

ESAME COLTURALE tradizionale

COLONIA SOSPETTA → **CONFERMA**

- mycobactin dipendenza
- acido R
- IS 900 +
- lenta crescita

CEPPI OVINI:
Crescita molto lenta (fino a 40 settimane)
Crescita stentata su HEY
Ceppi talvolta pigmentati



COLONIE SOSPETTE DA FECI → **CONFERMATE**

***ANNO 2005*: 208** → **207 (99,5%)**

Mycobactin	dipendente	indipendente	dipendente
IS900	positivo	positivo	negativo

Map

Map
Maa
M. coockii
M. scrofulaceum
M. porcinum

Mas
Maa

NECESSARI MARKER GENETICI AGGIUNTIVI

ESAME COLTURALE tradizionale

PRELIEVI : feci (sing. o pool), tessuti, latte, seme, ambiente

RISULTATI : qualitativi o semi-quantitativi

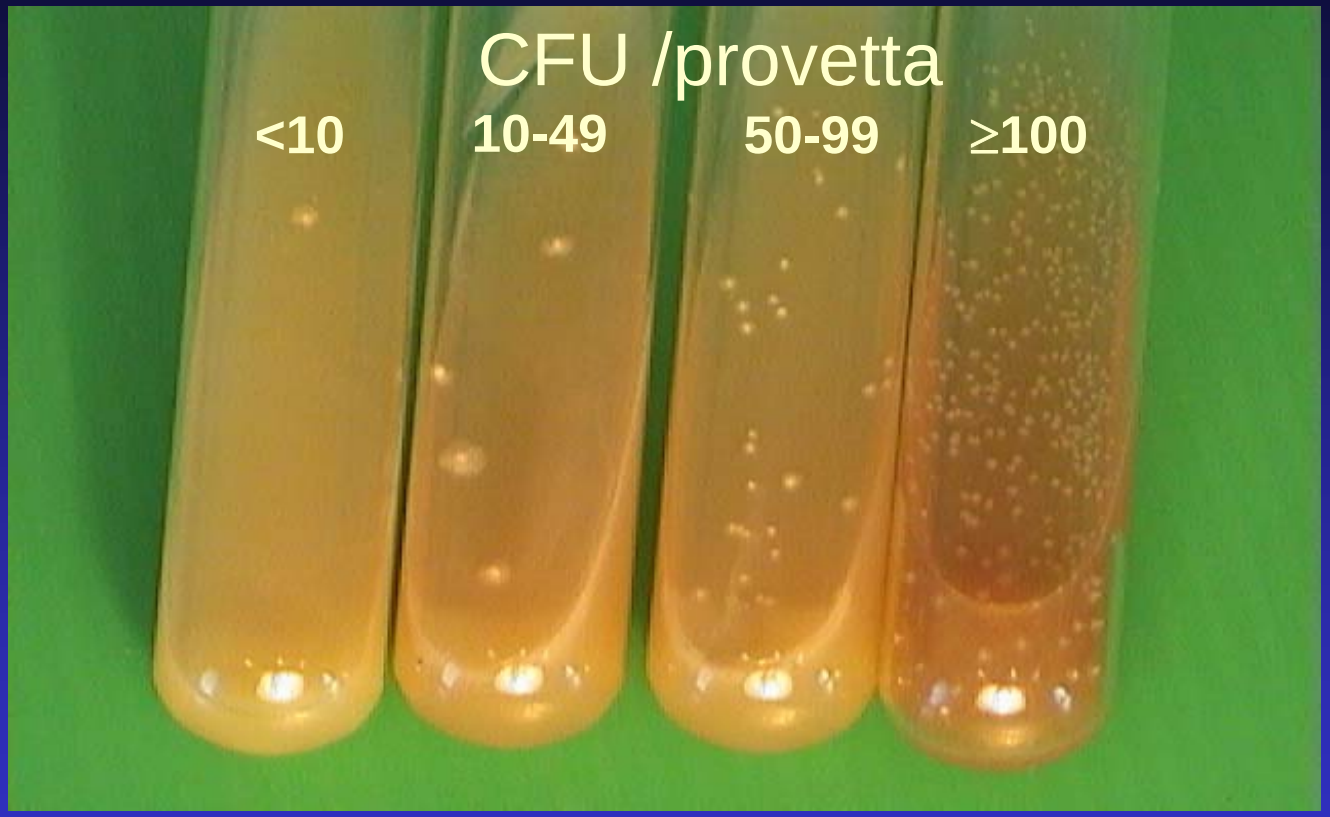
VANTAGGI : massima sensibilità tra i test disponibili

100% specificità
- mycobactin dipendenza
- lenta crescita
- acido R
- IS 900 +

individua i soggetti eliminatori
non necessita di attrezzature particolari
studi di epidemiologia molecolare dai ceppi

RISANAMENTO di un ALLEVAMENTO
CERTIFICAZIONE di un ALLEVAMENTO
CONFERMA di un CASO CLINICO

ESAME COLTURALE: espressione del risultato



Low shedder → Moderate shedder → High shedder → Super shedder → 6-12 mesi → MALATTIA

Importanza della valutazione quantitativa della coltura fecale

1 Super Shedder **subclinica** elimina da 10.000 a 1.000.000 CFU di *Map* per grammo di feci

1 Super Shedder equivale a:

162	**Heavy Shedders**
2.070	**Moderate Shedders**
23.809	**Low Shedders**

Whitlock 2005, 8ICP

ESAME COLTURALE tradizionale

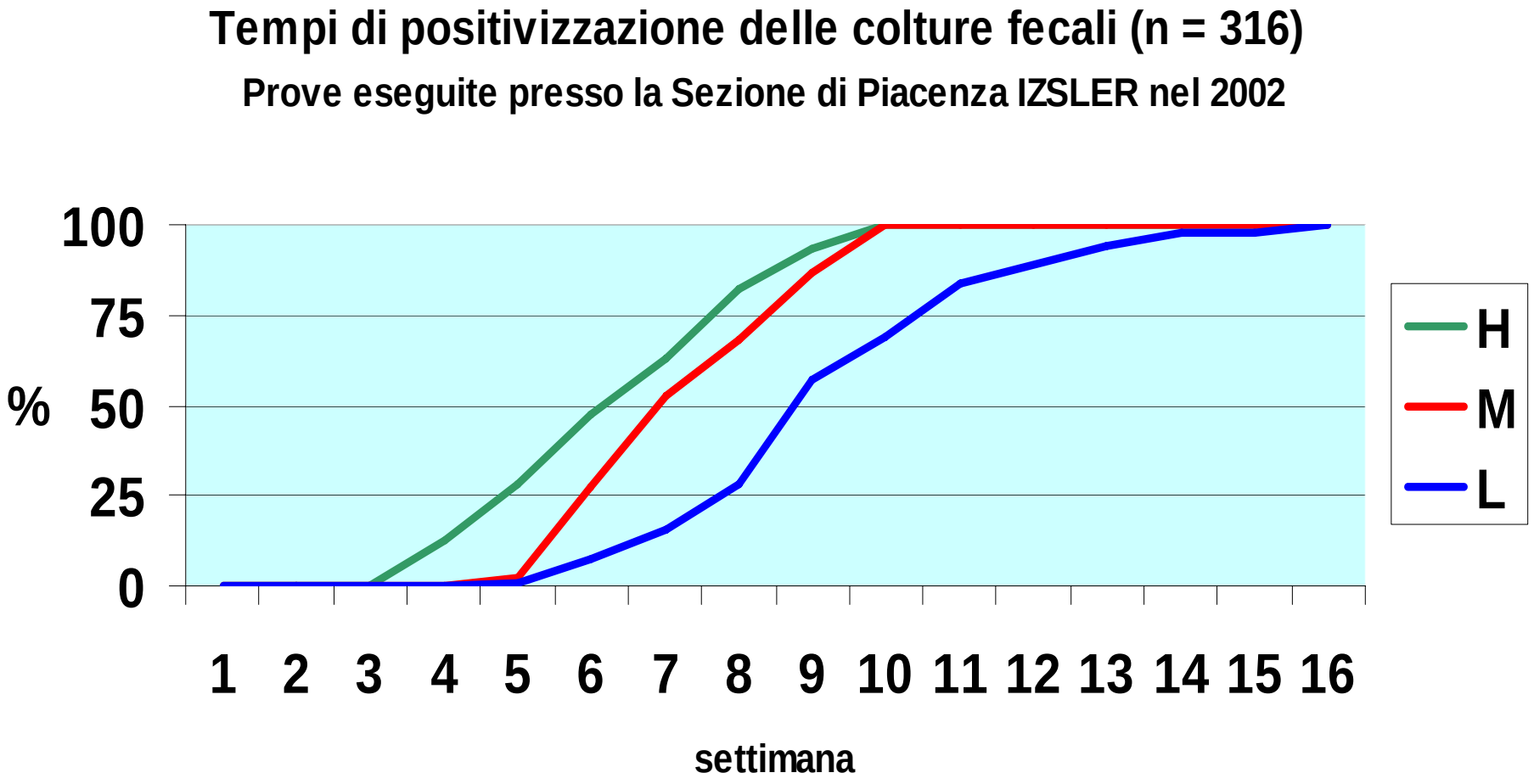
SVANTAGGI:

- lunghi tempi di incubazione (4-16 settimane)
- costi elevati
- poco standardizzata (personale, terreno)

- falsi negativi
  - sensibilità 50% (soglia > $10\text{-}10^4$ UFC/gr.)
  - inquinamento colture

- falsi positivi per transito passivo?

ESAME COLTURALE tradizionale



ESAME COLTURALE tradizionale: problemi!!

ESAME COLTURALE: RISULTATI DEI SINGOLI TERRENI SU 328 CAMPIONI POSITIVI

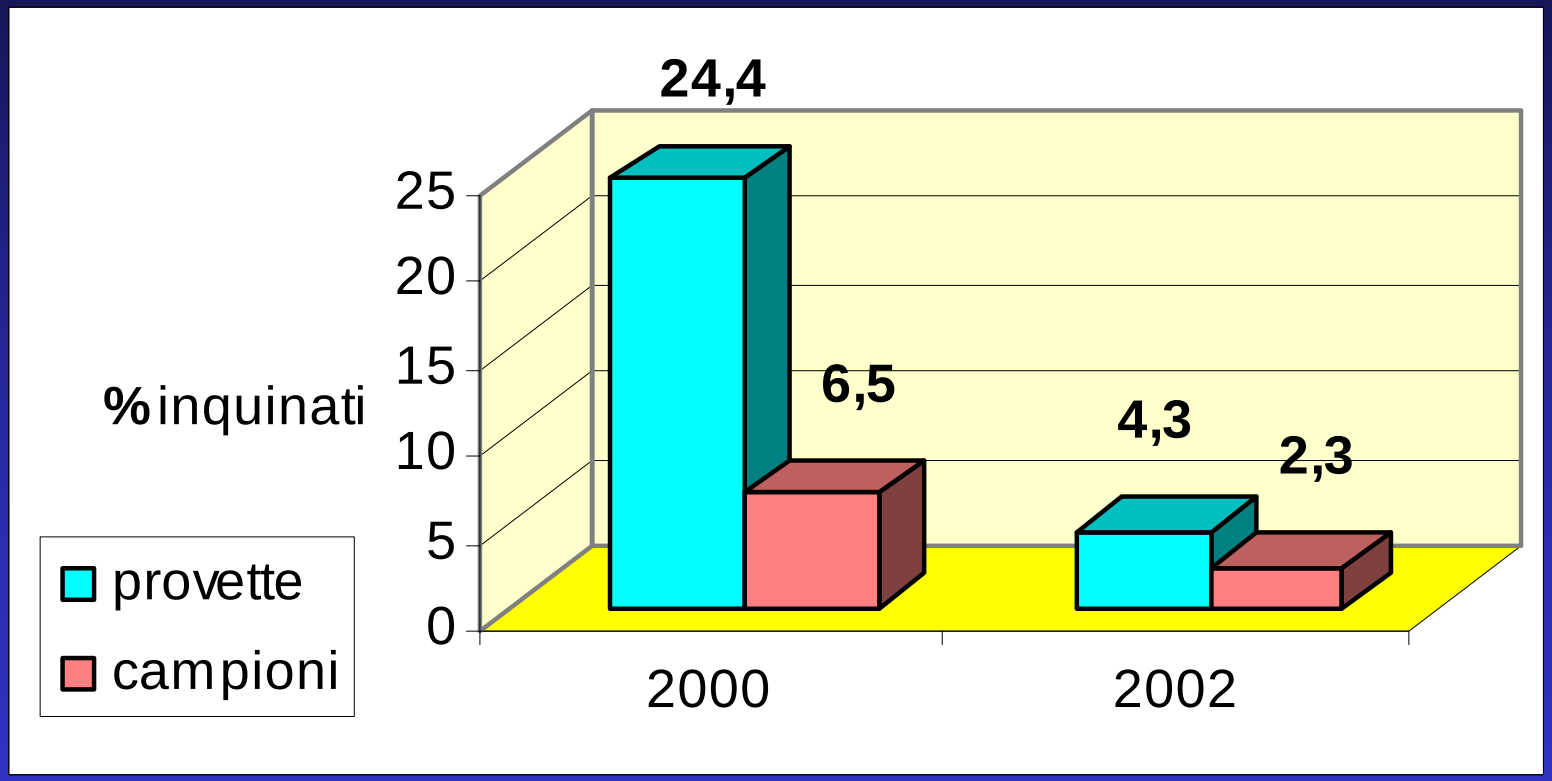
	HEYM	HEYMP	HEYM-CAF	HEYMP-ANV
+	52.1 %	56.4 %	64.3 %	77.1 %
-	40.6 %	24.4 %	34.2 %	18.3 %
INQ	7.3 %	19.2 %	1.5 %	4.6 %

HEYM = terreno di Herrold al tuorlo d'uovo + mycobactin
HEYMP = HEYM + Na piruvato
HEYM-CAF = HEYM + Cloramfenicolo
HEYMP-ANV = HEYM + Na piruvato+ Vancomicina+ Acido Nalidixico

ESAME COLTURALE

Confronto tra differenti terreni colturali

Prove effettuate presso la Sezione di Piacenza IZSLER



2000: 1 HEYM + 1 HEYMP + 1 HEYM-CAF
2002: 2 HEYMP-ANV + 2 HEYM-CAF

ESAME COLTURALE: METODI ALTERNATIVI

- RADIOMETRICI (Bactec)
- FLUORIMETRICI (MGIT)
- Altro (Trek)

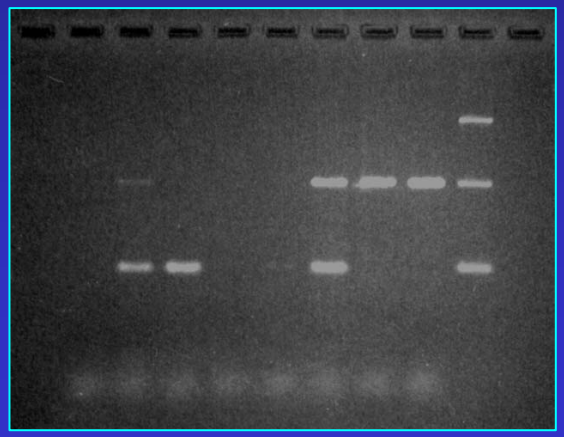
Vantaggi	Svantaggi
Più rapidi	Costo attrezzature
Più sensibili (ovini e CD)	Costo terreni
Dati semiquantitativi	Necessità conferma PCR

PCR FECI

1 g di feci in 20 ml acqua distillata

Lisi meccanica
(Mixer Mill)

Lisi chimica
(Kit Adiavet, Adiagene)



Amplificazione
(Kit Adiavet, Adiagene)

PCR IS900

- **PRELIEVI:** feci, tessuti, latte, seme
- **RISULTATI:** qualitativi o quantitativi (RT-PCR)
- **VANTAGGI:** rapidità di risposta (24-48 ore)
  non risente di inquinamenti
  evidenzia anche ceppi non coltivabili
  specificità elevata da feci

PCR IS900

SVANTAGGI:

- **falsi negativi:** inibitori
  sensibilità > 10^2 - 10^4 UFC/gr

- **falsi positivi:** contaminazione
  sequenze IS900-like in ceppi ≠ da Map

- **necessita di attrezzature particolari**
- **necessita di personale specializzato**
- **costi elevati**

CONFERMA DEI CEPPI ISOLATI IN COLTURA
CONFERMA AL TAVOLO ANATOMO PATOLOGICO
CONFERMA DI UN CASO CLINICO
COMPRAVENDITA / ESPORTAZIONE

CONFRONTO PCR e COLTURA da feci bovine

Fecal shedding status	Kit A (IDEXX)	Kit B (Adiagène)	Kit C (I.Pourquier)
Light (<20)	12/25 (48%)	8/25 (32%)	7/25 (28%)
Moderate (20-50)	13/22 (59%)	10/22 (45%)	11/22 (50%)
Heavy (>50)	29/33 (88%)	30/33 (91%)	31/33 (94%)
Combined	54/80 (67,5%)	48/80 (60%)	49/80 (61,3%)

Taddei S., Robbi C., Cesena C., Rossi I., Schiano E., Arrigoni N., Vicenzoni G., Cavirani S.: Detection of Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis in bovine fecal samples: comparison of three PCR-based diagnostic tests with a conventional culture method.

J.Vet.Diagn.Invest.16:503-508 (2004)

Ricerca di *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis (Map)* da feci bovine: confronto tra quattro differenti metodi PCR

Taddei R., Belletti GL., Beltrami A., Tamba M., Arrigoni N.

Centro Referenza Nazionale Paratubercolosi IZSLER Sez. Piacenza

Obiettivi

- **Confronto tra quattro diversi protocolli di analisi PCR per la ricerca di Map da feci bovine, che differiscono sia nella fase di estrazione che nella fase di amplificazione**
- **La sensibilità delle diverse metodiche è stata messa in relazione con l'esito della coltura fecale.**

Materiali e Metodi

Composizione panel di campioni

35 campioni **di feci bovine** ***negative*** **alla coltura, appartenenti ad una stalla indenne da Paratubercolosi**

35 campioni di **feci bovine,** ***positive*** **alla coltura a diverso livello di escrezione**

Composizione panel campioni positivi

N° campioni	Esito esame colturale	N° colonie per provetta
13	+ (escrezione bassa)	≤ 10
9	+ + (escrezione moderata)	11-50
13	+ + + (escrezione alta)	≥50

Protocolli analitici PCR

Metodo	Estrazione	Amplificazione
1	Lisi chimica (kit ADIAVET ParaTB)	PCR tradizionale (kit ADIAVET ParaTB)
2	Lisi meccanica+chimica (kit ADIAVET ParaTB)	PCR tradizionale (kit ADIAVET ParaTB)
3	Lisi meccanica+chimica (kit ADIAVET ParaTB)	PCR Real-time (kit LCSet – TibMolBiol)
4	Lisi meccanica+chimica (kit Q-PCR – I.Pourquier)	PCR Real-time (kit Q-PCR – I.Pourquier)

Protocolli estrazione

Metodo	Estrazione
1	Lisi chimica (kit ADIAVET ParaTB)
2	Lisi meccanica+chimica (kit ADIAVET ParaTB)
3	Lisi meccanica+chimica (kit ADIAVET ParaTB)
4	Lisi meccanica+chimica (kit Q-PCR – I.Pourquier)

- 1 g feci
- Tampone di lisi
- Proteinasi K
- QIAamp Mini kit

- 1 g feci
- Glass Beads
- TissueLyzer (Qiagen)
- Proteinasi K
- QIAamp Mini kit

- 1,5 g feci
- Glass Beads
- TissueLyzer (Qiagen)
- Proteinasi K
- QIAamp Mini kit

Protocolli analitici PCR

Metodo	Amplificazione
1	PCR tradizionale (kit ADIAVET ParaTB)
2	PCR tradizionale (kit ADIAVET ParaTB)
3	PCR Real-time (kit LCSet – TibMolBiol)
4	PCR Real-time (kit Q-PCR – I.Pourquier)

- IS900
- Gel di agarosio

- IS900
- Sonde FRET
- LightCycler 2.0 (Roche)

- IS900
- Sonde FRET
- LightCycler 2.0 (Roche)

Risultati

Metodo	Estrazione	Amplificazione
1	Chimica *ADIAVET*	PCR tradiz. *ADIAVET*
2	Meccanica+chimica *ADIAVET*	PCR tradiz. *ADIAVET*
3	Meccanica+chimica *ADIAVET*	RT PCR *TibMolBiol*
4	Meccanica+chimica *I.Pourquier*	RT PCR *I.Pourquier*

Esito coltura	N	Campioni positivi			
		Metodo 1	Metodo 2	Metodo 3	Metodo 4
Negativo	35	0	0	0	0
Positivo (+)	13	0 (0%)	9 (68%)	11 (85%)	10 (77%)
Positivo (++)	9	4 (44%)	9 (100%)	9 (100%)	9 (100%)
Positivo (+++)	13	12 (92%)	13 (100%)	13 (100%)	13 (100%)
Tot. positivi	35	16 (46%)	31 (89%)	33 (94%)	32 (91%)

Valutazione

Metodo	Estrazione	Amplificazione
1	Chimica *ADIAVET*	PCR tradiz. *ADIAVET*
2	Meccanica+chimica *ADIAVET*	PCR tradiz. *ADIAVET*
3	Meccanica+chimica *ADIAVET*	RT PCR *TibMolBiol*
4	Meccanica+chimica *I.Pourquier*	RT PCR *I.Pourquier*

Metodo	SE	*LF 95% SE*		SP	*LF 95% SP*		J	ACC	*LF 95% ACC*	
1	0,46	0,29	0,63	1,00	0,90	1,00	0,46	0,73	0,61	0,83
2	0,89	0,73	0,97	1,00	0,90	1,00	0,89	0,94	0,86	0,98
3	0,94	0,81	0,99	1,00	0,90	1,00	0,94	0,97	0,90	1,00
4	0,91	0,77	0,98	1,00	0,90	1,00	0,92	0,96	0,88	0,99

Correlazione con livello di contaminazione

Metodo	Estrazione	Amplificazione
1	Chimica *ADIAVET*	PCR tradiz. *ADIAVET*
2	Meccanica+chimica *ADIAVET*	PCR tradiz. *ADIAVET*
3	Meccanica+chimica *ADIAVET*	RT PCR *TibMolBiol*
4	Meccanica+chimica *I.Pourquier*	RT PCR *I.Pourquier*

Metodo	Chi-quadro	P
1	21,68	<0,001**
2	5,91	0,015*
3	2,77	0,096
4	4,29	0,038*

Influenza del metodo di estrazione sulla Sensibilità

Esito coltura	N° campioni analizzati	Campioni positivi			
		Metodo 1	Metodo 2	Metodo 3	Metodo 4
Negativo	35	0	0	0	0
Positivo (+)	13	0	9	11	10
Positivo (++)	9	4	9	9	9
Positivo (+++)	13	12	13	13	13
Totale positivi	35	16	31	33	32

Sensibilità significativamente differente ***(chi-quadro=12,69; p=0,0004)***

Influenza del metodo di estrazione sulla Sensibilità: Confronto tra metodi 1 e 2

- **I campioni analizzati con metodo 2 hanno probabilità 9 volte superiore dei campioni analizzati con metodo 1 di dare un esito PCR positivo**
  (OR=9,2; I.f.95%: 2,7-31,7)

- **Per i campioni con contaminazione bassa o moderata (+/++) la probabilità è risultata 20 volte superiore**
  (OR=20,3; I.f.95%: 4,4-93,8)

Influenza del metodo di amplificazione sulla Sensibilità

Esito coltura	N° campioni analizzati	Campioni positivi			
		Metodo 1	Metodo 2	Metodo 3	Metodo 4
Negativo	35	0	0	0	0
Positivo (+)	13	0	9	11	10
Positivo (++)	9	4	9	9	9
Positivo (+++)	13	12	13	13	13
Totale positivi	35	16	31	33	32

Sensibilità non significativamente differente *(chi-quadro=0,18; p=0,67),*

- **La lisi meccanica, affiancata alla lisi chimica tradizionale, ha permesso di aumentare significativamente la sensibilità del metodo PCR rispetto alla sola lisi chimica, raggiungendo livelli sovrapponibili a quelli delle colture fecali**

- **Le tecnologie di RT-PCR testate, seppure in grado di garantire specificità superiore, procedure più rapide e maggiore sicurezza, non hanno determinato un ulteriore aumento di sensibilità del metodo**

- **Alla luce delle recenti innovazioni, l'applicazione della PCR sulle feci, considerata fino ad oggi attendibile solo su animali con forma clinica, potrebbe ipotizzarsi anche per la diagnosi di Paratubercolosi su animali in fase subclinica, nell'ambito di indagini finalizzate al controllo o all'eradicazione.**

ESAME COLTURALE LATTE
(tecnica per centrifugazione)

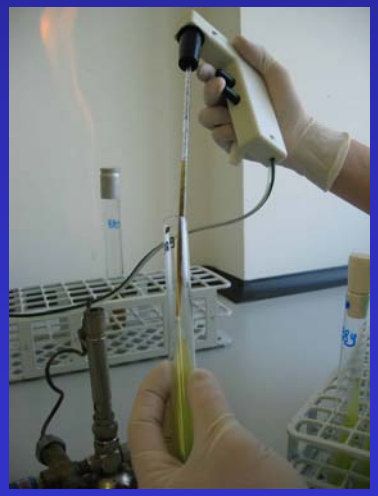
Centrifugare 50 ml
a 2500 g per 15 min

Eliminare il surnatnate
e risospendere il pellet
in 25 ml HPC 0,75%

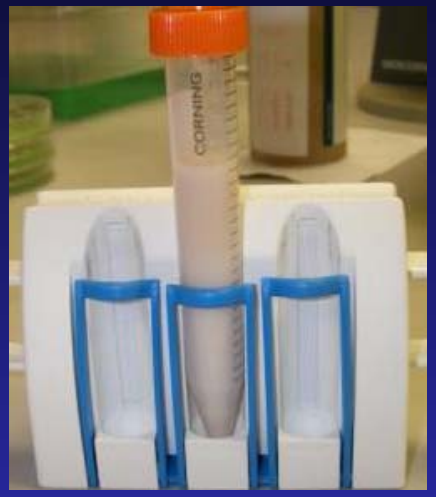
Incubazione a 21 °C per 5 ore
Centrifugare a 2500 g per 15 min

Eliminare il surnatnate e
risospendere il pellet in
0,8 ml di PBS-Tween 20
(0,05%)

Seminare 0,2 ml
di sedimento in
4 provette (2 HEYMP-
ANV e 2 HEYM-CAF)
e incubare a 37 °C
per 4 -16 settimane



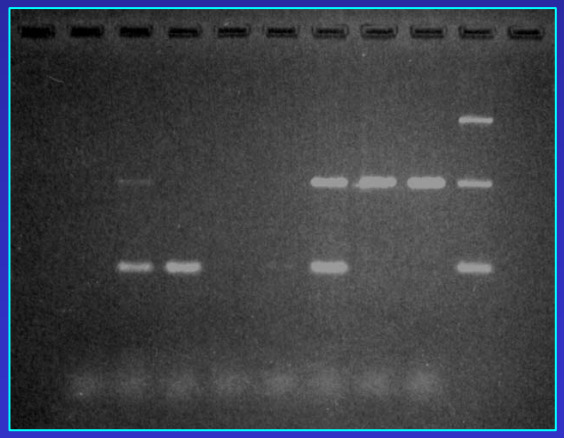
PCR LATTE



Separazione magnetica
(kit Adiapure – Adiagene)

Lisi meccanica
(Mixer Mill)

Lisi chimica
(Kit Adiavet, Adiagene)

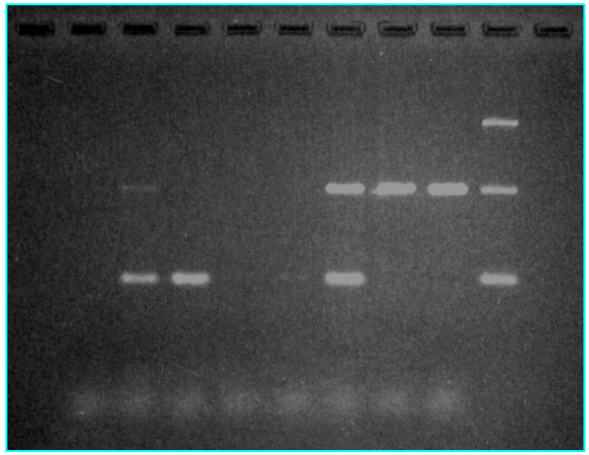


Amplificazione
(Kit Adiavet, Adiagene)

Obbiettivo 2: Conoscere la % di aziende infette produttrici di latte contaminato da MAP mediante coltura e PCR

Sono state messe a punto le tecniche finalizzate a mettere in evidenza *Map* dalla matrice latte.

IN CONDIZIONI SPERIMENTALI:



PCR
Limite di rilevabilità:
10-100 u.f.c./ml

Coltura
Limite di rilevabilità:
1 u.f.c./ml

Campionamento

- 52 aziende da latte infette
- campionamento ripetuto del latte di massa (3,5 camp/azienda a distanza di almeno 30 gg)
- totale 183 campioni

ANALISI MEDIANTE

COLTURA

decontaminazione HPC

centrifugazione

semina su HEYM

(Dundee e coll. 2001)

PCR

separazione magnetica

lisi meccanico/chimica

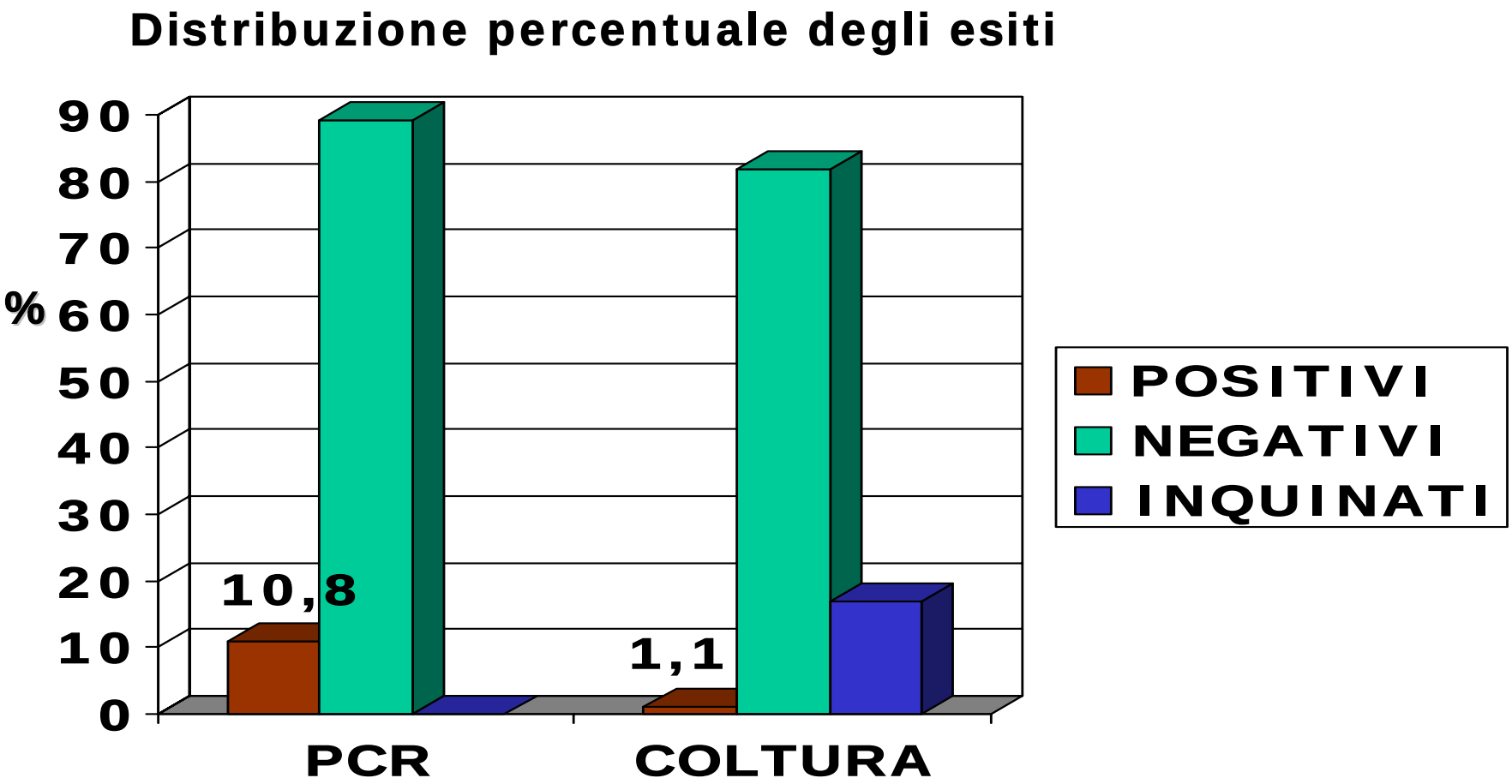
(kit commerciale)

Nested/Duplex PCR

(in house)

Campioni di latte di massa contaminati da Map (PCR e coltura)

183 campioni prelevati da 52 aziende



Aziende infette produttrici di latte contaminato da Map (coltura e PCR)

Le aziende produttrici di latte contaminato sono risultate 11 su 52 aziende infette campionate

Prevalenza stimata aziende infette produttrici di latte contaminato da Map: 21,2% (l.f.95%:11,1-34,7%)

Esame colturale dal latte di massa: considerazioni

Frequenti contaminazioni da parte di microrganismi ambientali (*Mycobacterium porcinum)*, inibenti la crescita di Map

- **false negatività**
- **limitata sensibilità del metodo diagnostico**
- **precauzioni prelievo e conservazione campioni**

PCR dal latte di massa: Considerazioni

Vantaggi:
più rapida e più sensibile rispetto al test colturale
(10,8% vs. 1,1% dei campioni provenienti da aziende infette)

Svantaggi:
problemi di reazioni falsamente positive da Micobatteri diversi da Map, portatori di sequenze IS900 like (*M.porcinum*), risolti con introduzione di PCR nested specifica per Map

VETMIC-3961; No. of Pages 10
ARTICLE IN PRESS

ELSEVIER

Available online at www.sciencedirect.com
ScienceDirect

Veterinary Microbiology xxx (2007) xxx–xxx

veterinary microbiology

www.elsevier.com/locate/vetmic

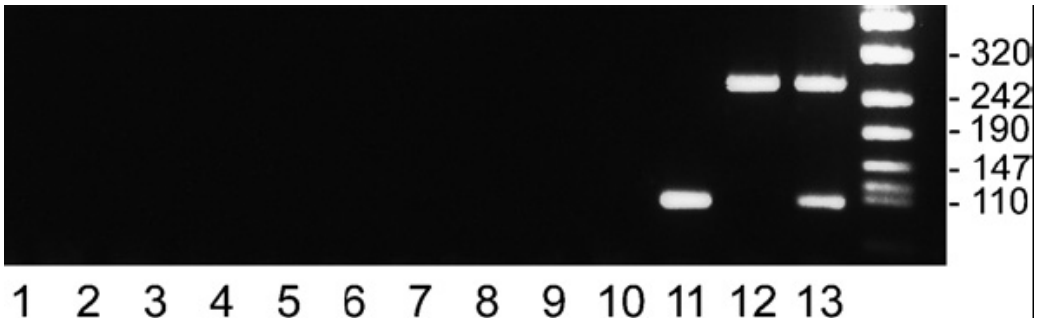
Mycobacterium porcinum strains isolated from bovine bulk milk: Implications for *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* detection by PCR and culture

R. Taddei [a,1,*], I. Barbieri [b], M.L. Pacciarini [b], F. Fallacara [b], G.L. Belletti [a], N. Arrigoni [a]

[a] *Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna, Centro di Referenza Nazionale Paratubercolosi, Sezione di Piacenza, Strada Faggiola 1, 29027 Gariga di Podenzano, Piacenza, Italy*

[b] *Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna, Centro di Referenza Nazionale Tubercolosi, Sede di Brescia, Via A. Bianchi 9, 25124 Brescia, Italy*

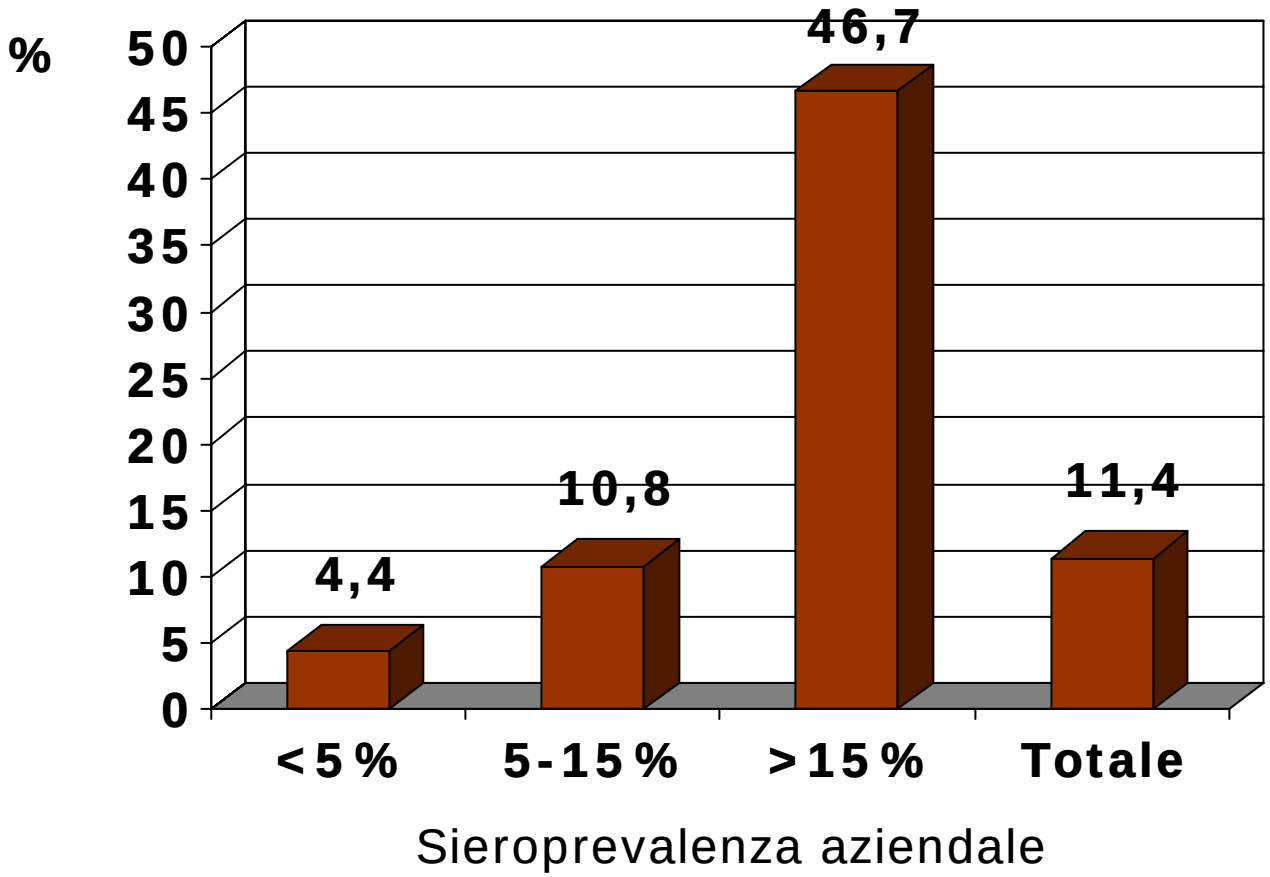
Received 15 October 2007; received in revised form 11 February 2008; accepted 14 February 2008



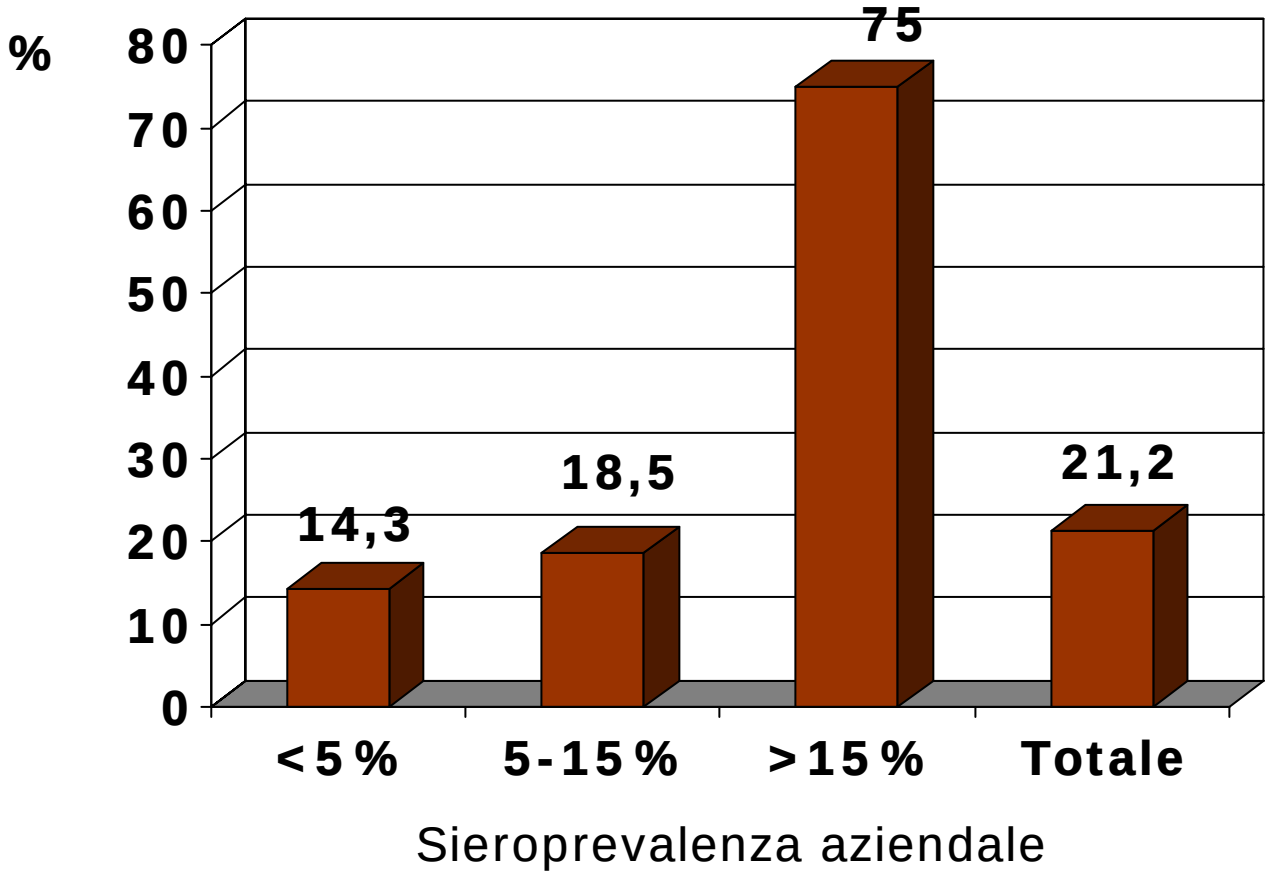
Duplex-PCR differenziale

Lane 1: M.peregrinum
Lane 2: M.smegmatis
Lane 3: M.fortuitum
Lane 4: M.gordonae
Lane 5: M.kansasii
Lane 6: M.scrofulaceum
Lane 7: M.bovis
Lane 8: M.phlei
Lane 9: M.avium subsp.avium
Lane 10: M.porcinum ATCC33776
Lane 11: M.porcinum ATCC19698
Lane 12: M. avium subsp.paratuberculosis
Lane 13: M. avium subsp.paratuberculosis + M.porcinum

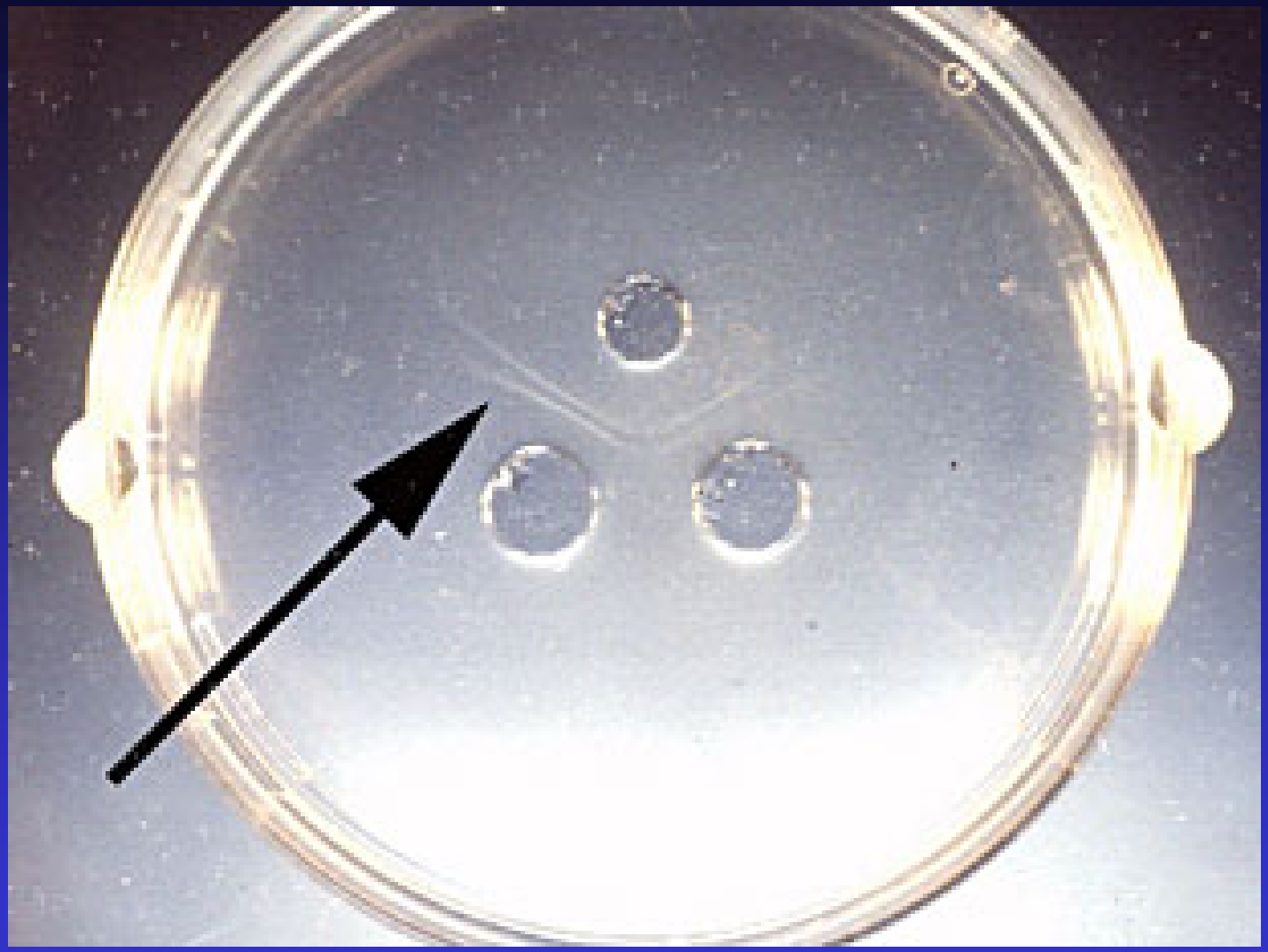
% di campioni di latte di massa contaminati da Map in funzione della sieroprevalenza aziendale



Aziende produttrici di latte contaminato da Map in funzione della sieroprevalenza aziendale



AGID

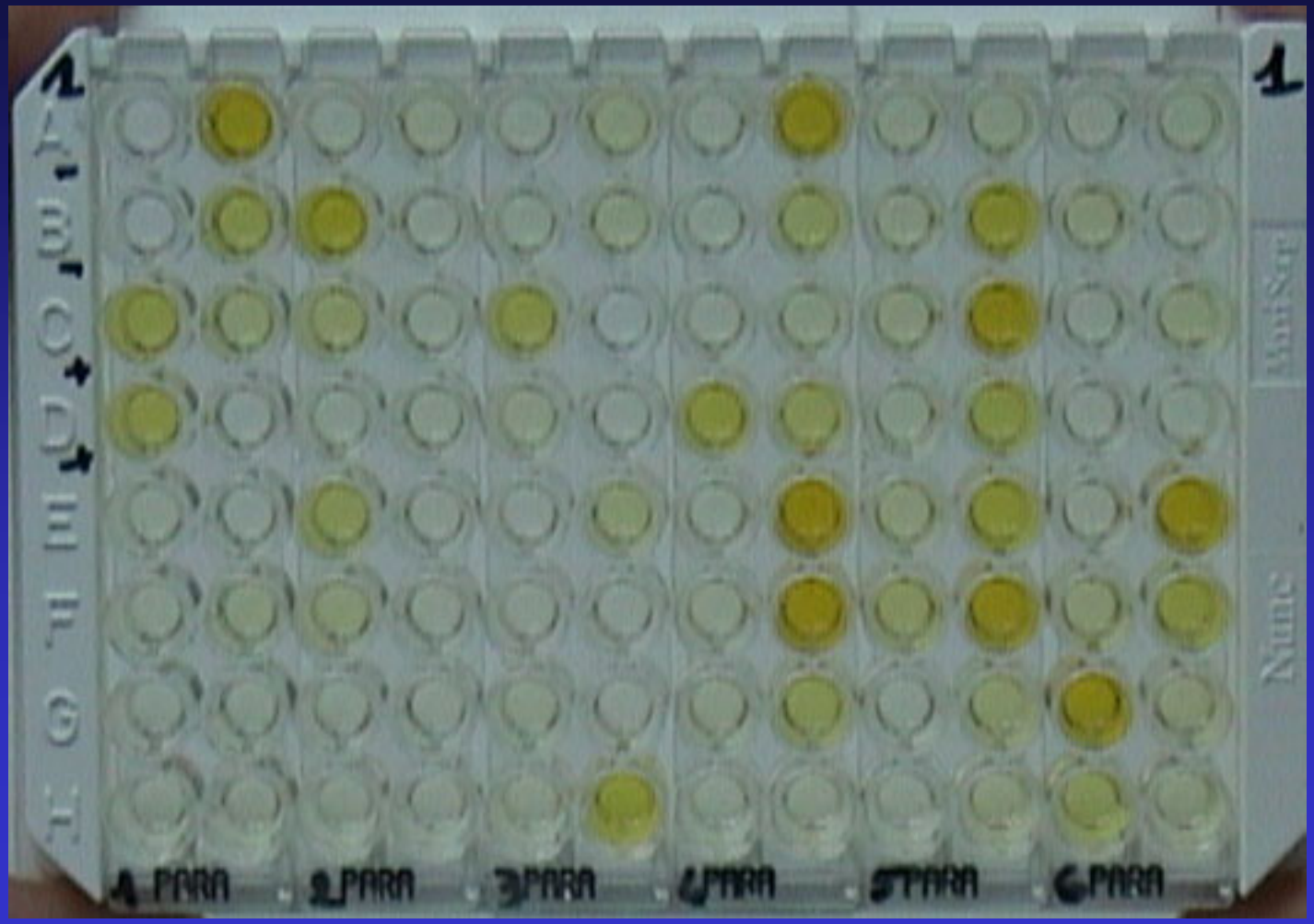


AGID

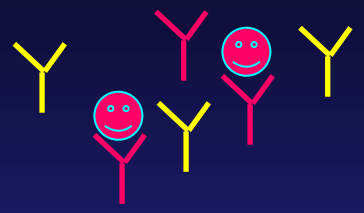
- **PRELIEVI:** sangue
- **RISULTATI:** qualitativi (+/-)
- **VANTAGGI:** ottima specificità
  rapido ed economico
  buona sensibilità in fase clinica
- **SVANTAGGI:** bassa sensibilità preclinica (26,8%)

DIAGNOSI DI UN CASO CLINICO

ABSORBED ELISA



ABSORBED - INDIRECT ELISA

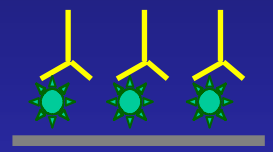


PREADSORBIMENTO DEI SIERI IN ESAME

Ab anti MAP

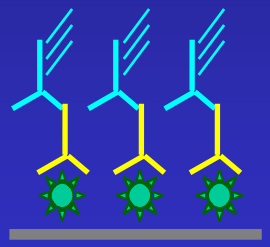
anticorpo anti Micobatteri atipici

antigene M.phley



LEGAME ANTIGENE ANTICORPO

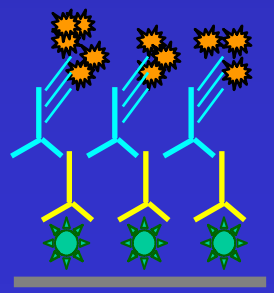
antigene MAP



AGGIUNTA DEL CONIUGATO

IgG anti-specie purificate

marcate con l'enzima



AGGIUNTA DEL SUBSTRATO

substrato dell'enzima

ABSORBED ELISA

$$\text{S/P ratio} = \frac{\text{OD campione - OD controllo negativo}}{\text{OD controllo positivo - OD controllo negativo}}$$

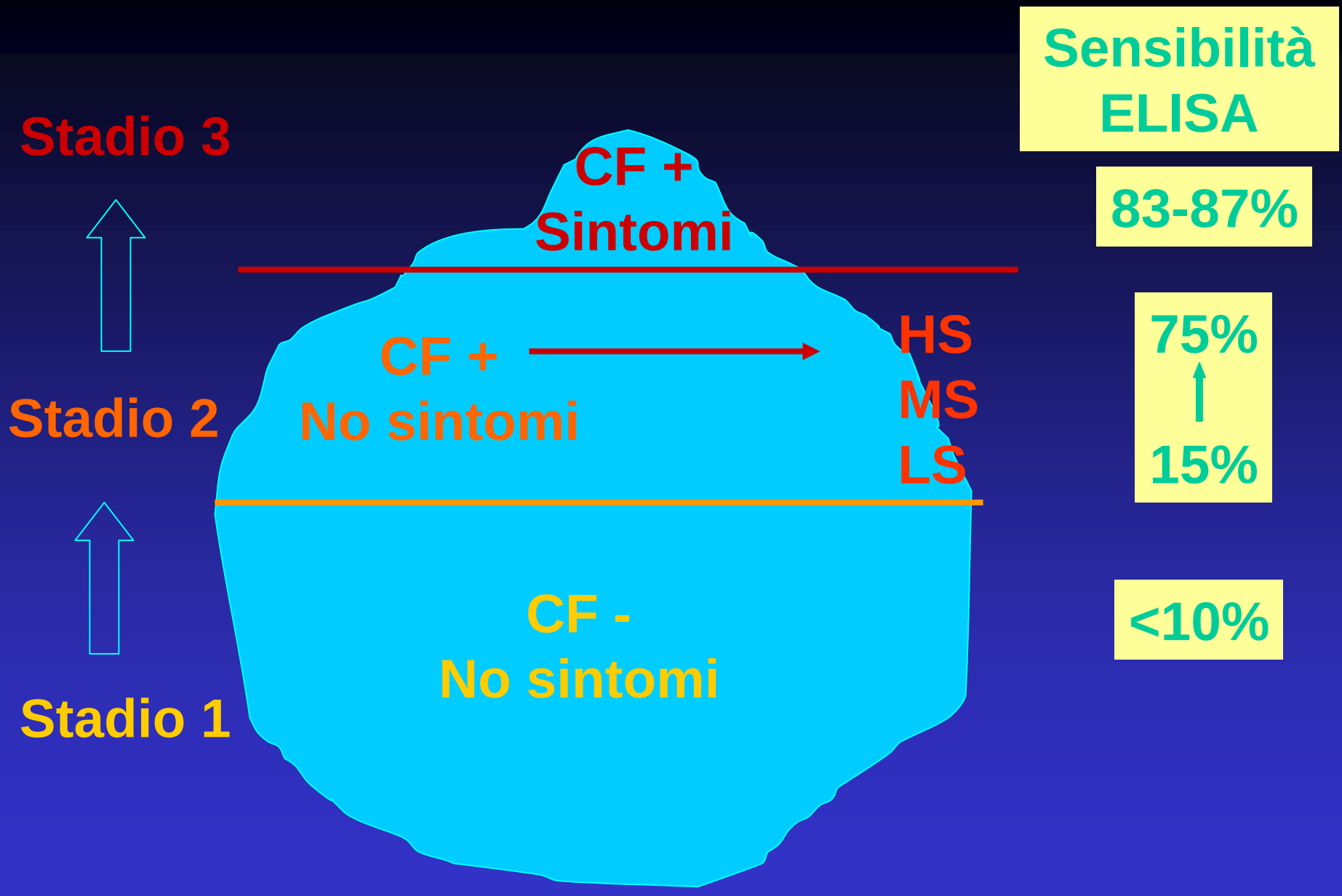
CUT OFF DIVERSO PER I VARI KIT DEL COMMERCIO:

IDVET	0,600 - 0,700
POURQUIER	0,600 - 0,700
SVANOVA	0,310 - 0,530

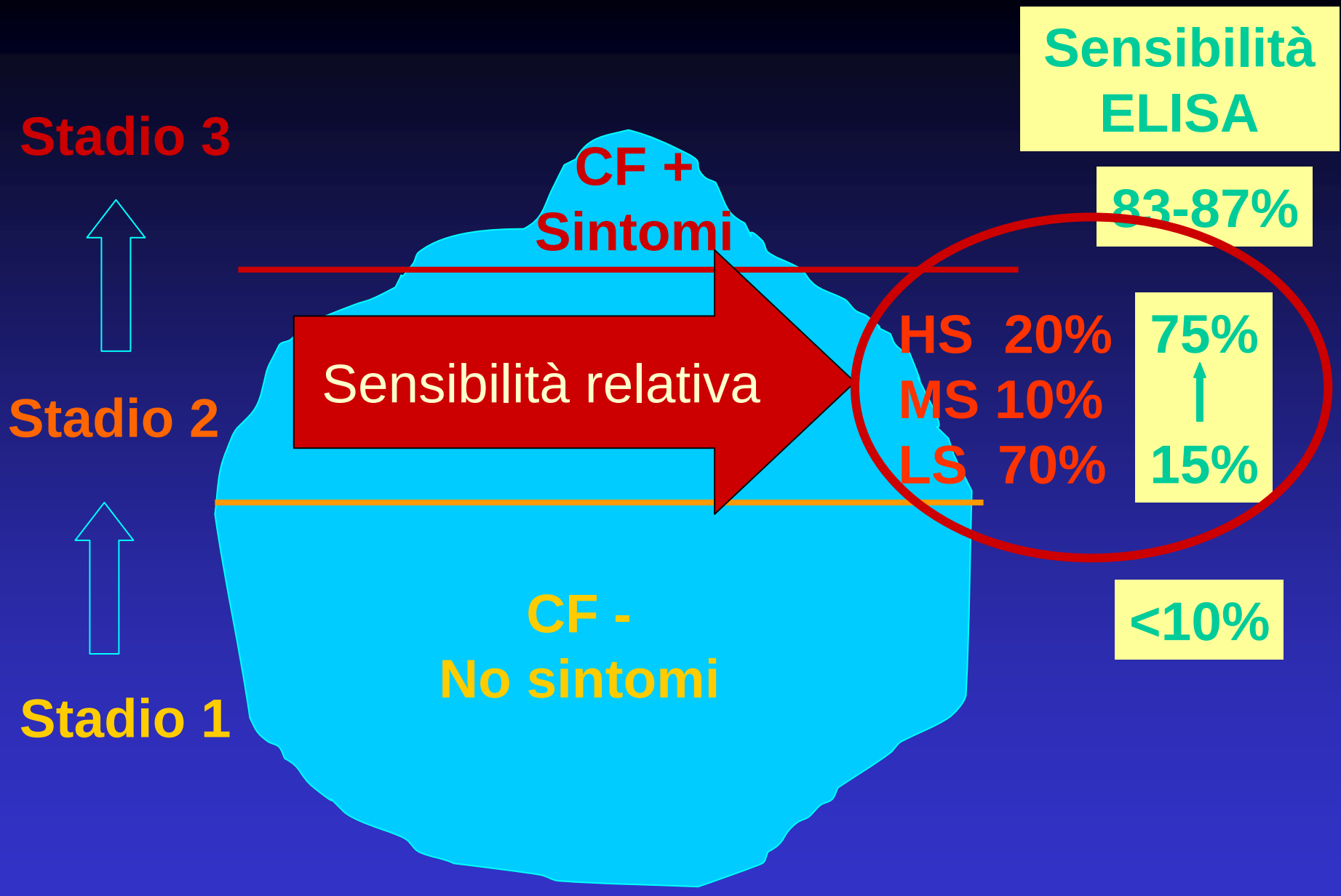
ABSORBED ELISA

- **PRELIEVI:** sangue e latte
- **RISULTATI:** quantitativi (S/P ratio)
- **VANTAGGI:** ottima specificità (> 99%)
  rapido ed economico
  buona sensibilità in fase clinica
- **SVANTAGGI:** bassa sensibilità preclinica
  i positivi non sempre sono eliminatori

DIAGNOSI DI UN CASO CLINICO
RISANAMENTO di un ALLEVAMENTO
CERTIFICAZIONE di un ALLEVAMENTO
COMPRAVENDITA / ESPORTAZIONE



Whitlock R.H. et al., Vet.Microb. 77 (2000), 387-398



Whitlock R.H. et al., Vet.Microb. 77 (2000), 387-398

La valutazione della sensibilità del test è funzione di:

distribuzione degli stadi di infezione nella popolazione campionata

sensibilità del gold standard utilizzato

- tipo di metodica
- studio prospettico
- test in più laboratori con metodiche differenti

DIAGNOSI DI PARATUBERCOLOSI BOVINA: VALUTAZIONE DI UN TEST ELISA DEL COMMERCIO SU SIERO E LATTE DI ANIMALI INFETTI IN FORMA SUBCLINICA

Sensibilità test ELISA su sangue e latte

ESITO colture fecali	ELISA latte + sangue +	ELISA latte + sangue -	ELISA latte - sangue +	ELISA latte - sangue -	totale	SENSIBILITA'	
						latte	sangue
LS	6	1	2	26	35	20 %	23 %
MS	4	-	1	-	5	80 %	100 %
HS	9	-	-	1	10	90 %	90 %
totale	19	1	3	27	50	40 %*	44 %**

* Latte I.f. (95%): 30,0% - 53,7% ** Sangue I.f. (95%): 26,4% - 54,8%

Arrigoni et al. , Sidilv 2004

DIAGNOSI DI PARATUBERCOLOSI BOVINA: VALUTAZIONE DI UN TEST ELISA DEL COMMERCIO SU SIERO E LATTE DI ANIMALI INFETTI IN FORMA SUBCLINICA

Specificità

Animali non infetti		ELISA LATTE		TOTALE
		POSITIVO	NEGATIVO	
ELISA SANGUE	POSITIVO	0	0	0
	NEGATIVO	0	130	130
	TOTALE	0	130	130

Specificità 100% (I.f. 95%: 97,2%-100%)

Arrigoni et al. , Sidilv 2004

DIAGNOSI DI PARATUBERCOLOSI BOVINA: VALUTAZIONE DI UN TEST ELISA DEL COMMERCIO SU SIERO E LATTE DI ANIMALI INFETTI IN FORMA SUBCLINICA

Concordanza

Animali infetti		ELISA LATTE		TOTALE
		POSITIVO	NEGATIVO	
ELISA SANGUE	POSITIVO	19	3	22
	NEGATIVO	1	27	28
	TOTALE	20	30	50

K= 0,84 (ottima per K>0,80)

Arrigoni et al. , Sidilv 2004

DIAGNOSI DI PARATUBERCOLOSI BOVINA: VALUTAZIONE DI UN TEST ELISA DEL COMMERCIO SU SIERO E LATTE DI ANIMALI INFETTI IN FORMA SUBCLINICA

Limite di rilevabilità

TQ	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	1:128	1:256
0,37	0,21	0,09	0,14	0,11	0,06	0,04	0,07	0,05
0,66	0,46	0,29	0,16	0,08	0,05	0,05	0,05	0,02
0,84	0,64	0,47	0,18	0,18	0,03	0,06	0,05	0,05
0,95	0,65	0,49	0,18	0,10	0,05	0,08	0,08	0,07
0,98	0,73	0,40	0,20	0,13	0,10	0,04	0,04	0,05
1,12	0,73	0,53	0,25	0,21	0,08	0,04	0,04	0,06
1,36	1,11	0,71	0,45	0,31	0,17	0,09	0,06	0,06
2,24	2,09	2,03	1,70	1,00	0,82	0,33	0,22	0,14

Arrigoni et al. , Sidilv 2004

DIAGNOSI DI PARATUBERCOLOSI BOVINA:

VALUTAZIONE DI UN TEST ELISA DEL COMMERCIO SU SIERO E LATTE DI ANIMALI INFETTI IN FORMA SUBCLINICA

1. **Potrebbe ipotizzarsi l'utilizzo del latte delle singole bovine per la diagnosi di paratubercolosi mediante test ELISA.**
2. **Il test ELISA, applicato al latte di massa, sembra idoneo ad identificare allevamenti con elevata prevalenza di infezione, ma non risulta idoneo per l'utilizzo all'interno di piani di certificazione aziendale**

Arrigoni et al. , Sidilv 2004

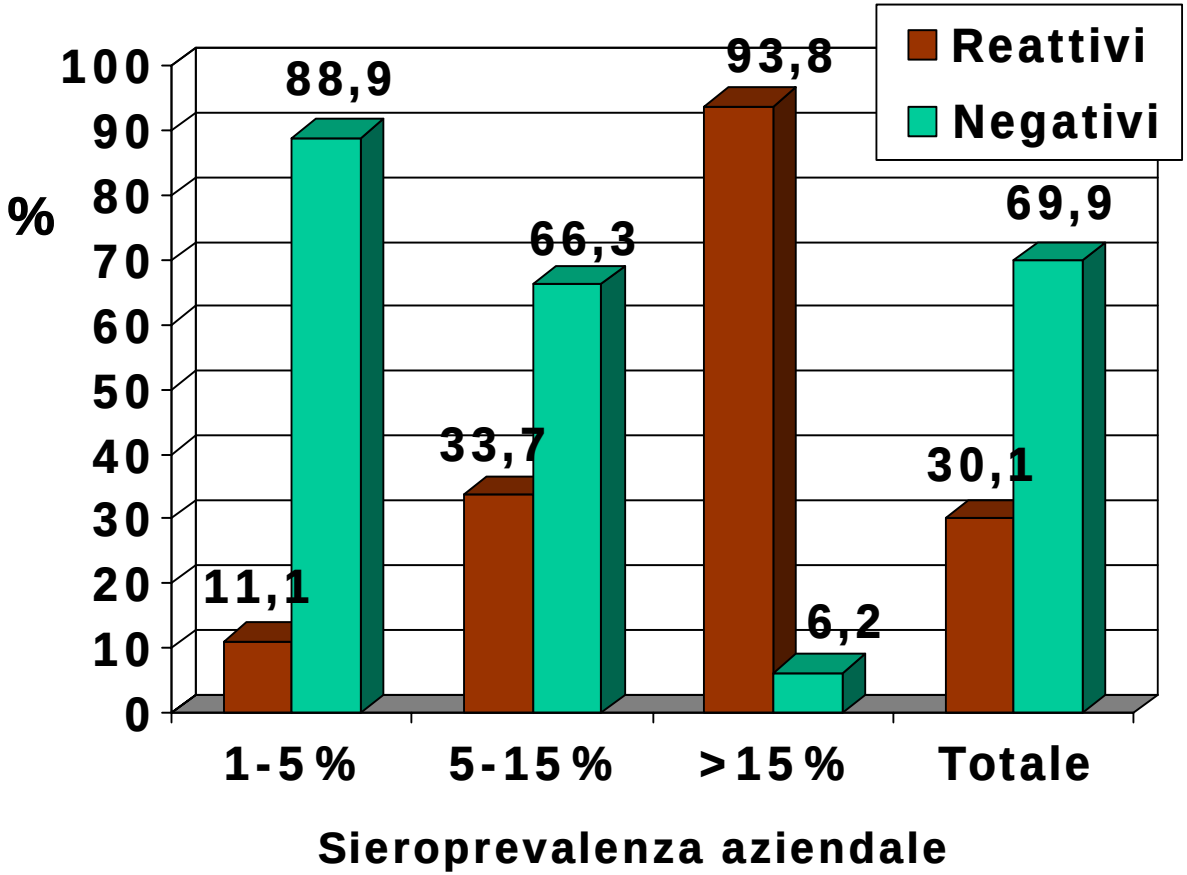
Obiettivo

Verificare sensibilità di un sistema di sorveglianza basato sull'esame sierologico su latte di massa

Campionamento

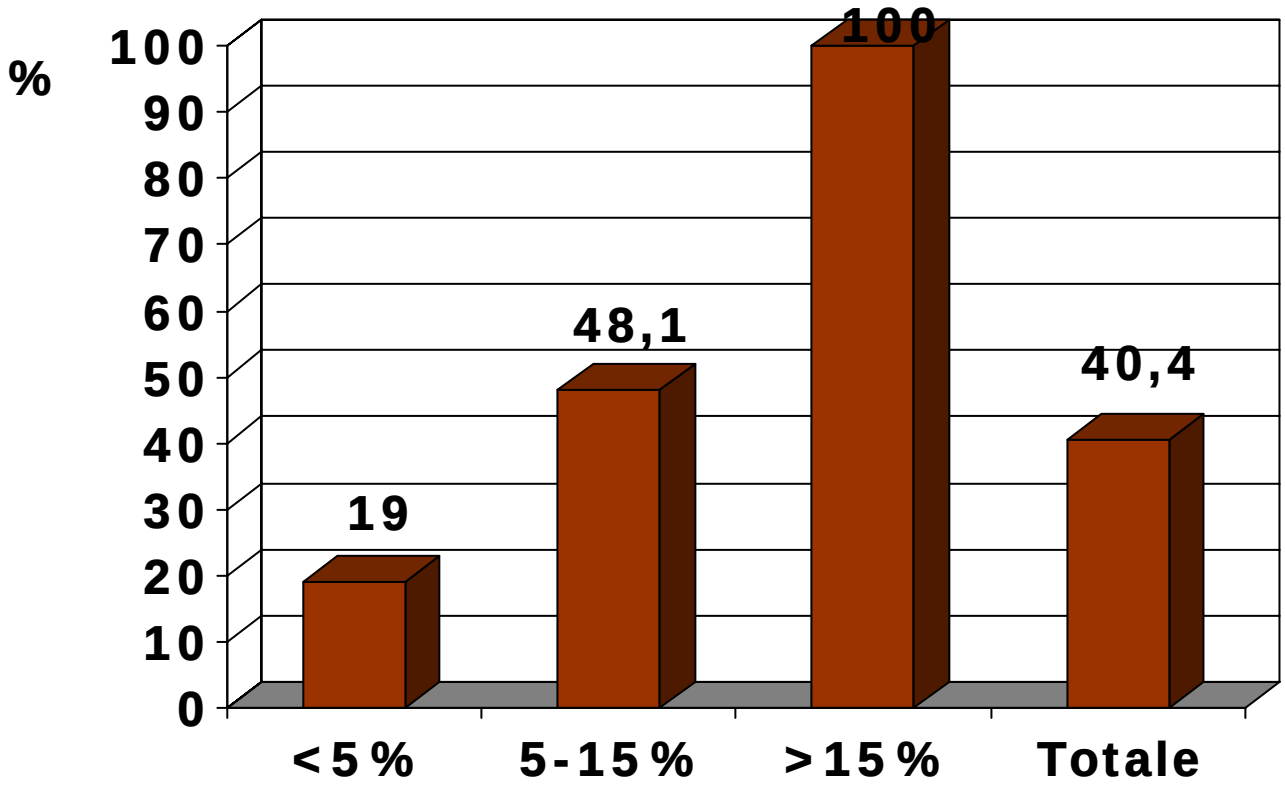
- 52 aziende da latte infette
- campionamento ripetuto del latte di massa (3,5 camp/azienda a distanza di almeno 30 g)
- totale 183 campioni

Sensibilità della prova ELISA su latte di massa calcolata sui campioni reattivi (positivi+dubbi) in funzione della sieroprevalenza aziendale



183 campioni di latte di massa prelevati da 52 aziende infette

% aziende infette positive al test ELISA dal latte di massa in funzione della sieroprevalenza aziendale

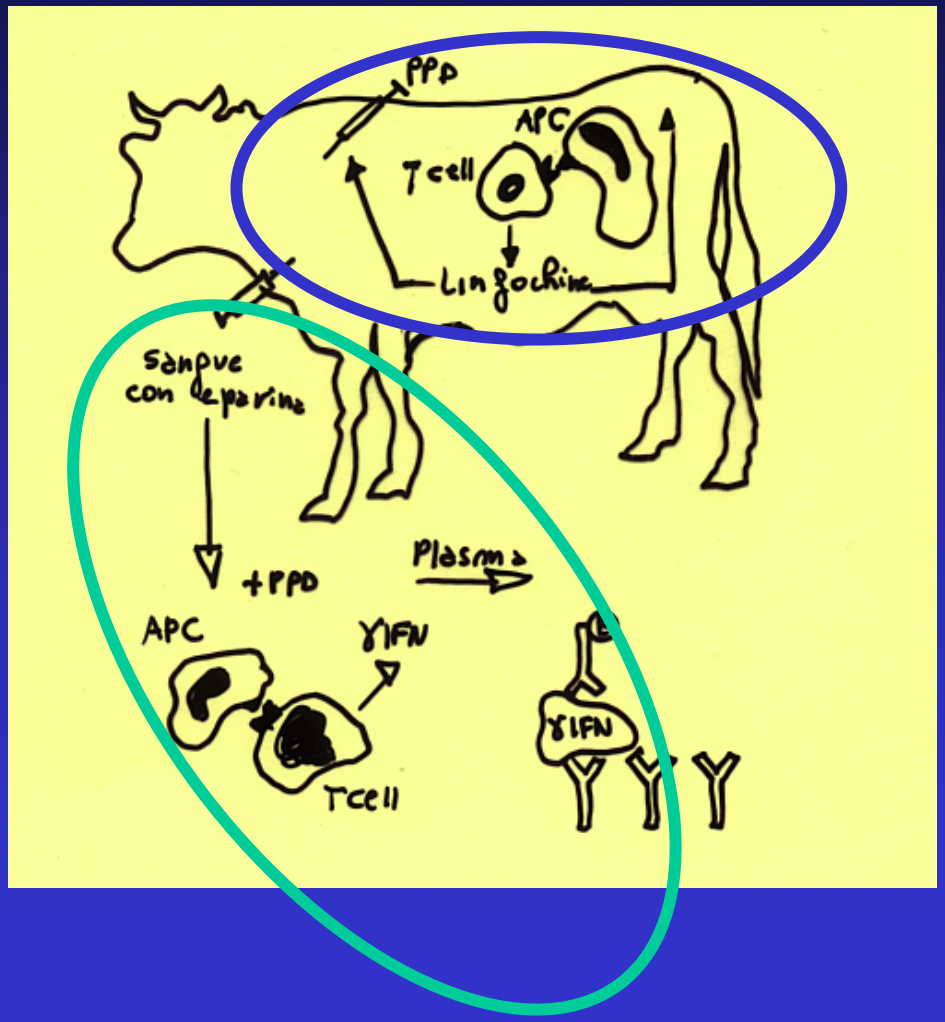


Sieroprevalenza aziendale

Test ELISA da latte di massa: Considerazioni

1) ***Valori di sensibilità media del 30,1% (I.f.$_{95}$ 27,5-37.3%)***
2) ***Valori sovrapponibili a quelli osservati in Olanda con lo stesso kit commerciale (30%) (Van Maanen 2005)***
3) ***Il campionamento ripetuto (3,5 campioni) aumenta la sensibilità (dal 30,1 al 40,4%)***
4) ***Sensibilità fortemente correlata alla sieroprevalenza aziendale***
5) ***Possibile utilizzo come strumento per individuare le aziende ad elevata sieroprevalenza, ma non per la dichiarazione di indennità (certificazione)***

Test del gamma-interferon per Paratubercolosi bovina



Principio

Il test si basa sulla capacità dei Linfociti T di sangue periferico di bovino infetto da *Map* di secernere in vitro linfochine di attivazione (tra cui il gamma-interferon) dopo essere venuti a contatto con Johnina

γ INTERFERON

Prelievo del campione di sangue dalla giugulare in litio eparina (5 ml)

Consegna al laboratorio entro 8 ore dal prelievo

Stimolazione del sangue intero con PBS, PPD aviare e johnina e incubazione per 16 ore

Centrifugazione e raccolta del plasma

Esecuzione del test “ELISA sandwich” per la rilevazione del γ interferon

Test del gamma-interferon

Interpretazione dei risultati (valori in OD)

PBS	Johnina PPD	PPD aviare
POSITIVO	Johnina > 0,05 + OD PBS e aviare	

Il test del gamma-interferon
Vantaggi

Nella applicazione in campo

- Risposta precoce (animali giovani)
- Consente di ripetere la prova senza limiti temporali, poiché non interferisce sul profilo della reazione immunitaria del bovino.
- Prevede un solo intervento in allevamento.
- Può essere accorpato con i prelievi per altri interventi di profilassi (Brucellosi, Leucosi).

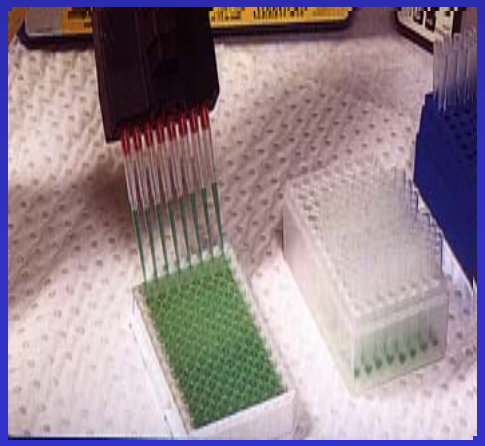
Nella applicazione in laboratorio

- Segue procedure standard (Accreditato SINAL dal 2001).
- Utilizza parametri di valutazione obiettivabili.
- Ha tempi rapidi di esecuzione (24 ore).
- E' possibile modulare la soglia diagnostica per ottimizzarne la sensibilità e la specificità, in relazione ad esempio alle caratteristiche epidemiologiche del territorio.

Il test del gamma-interferon
Svantaggi

Nella applicazione in campo

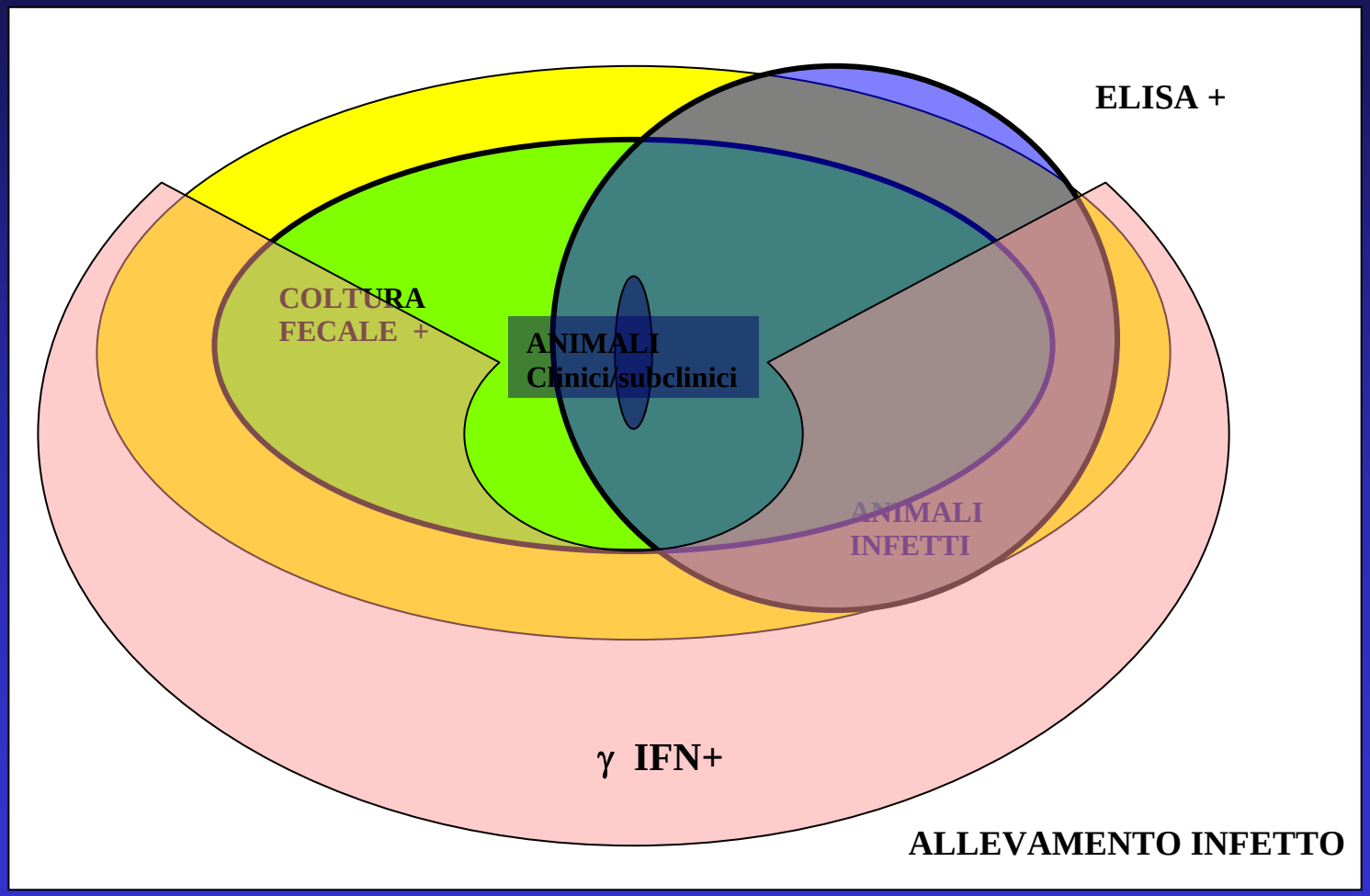
- La reattività al test non è costante nel tempo
- Anche tale test è soggetto a fenomeni di soppressione e/o anergia della risposta immunitaria (linfociti suppressor ?)
- Secrezione aspecifica di gamma-interferon durante alcune infezioni virali
- La co-infezione da micobatteri del gruppo avium-intracellulare può diminuirne la sensibilità e specificità



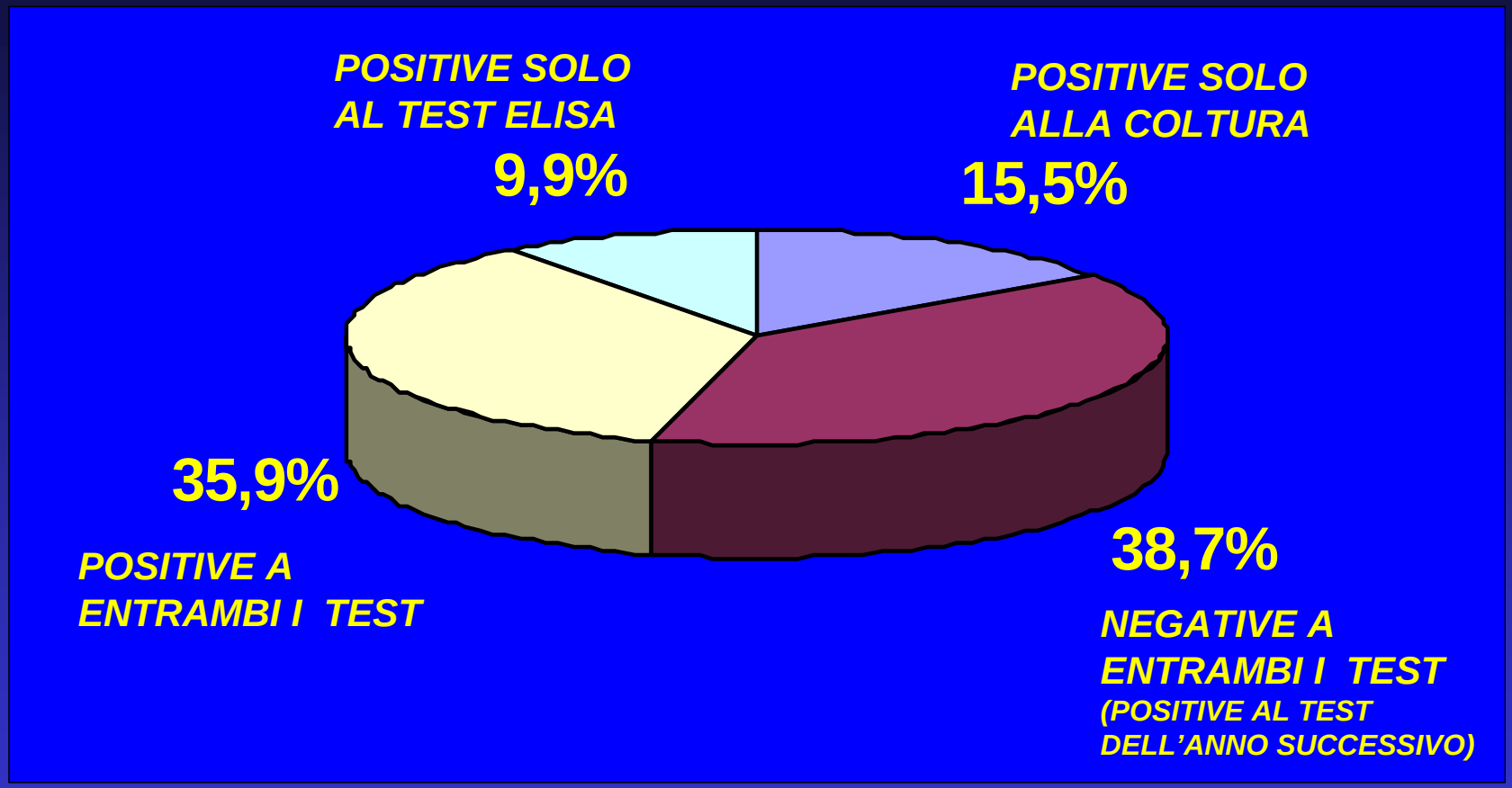
Nella applicazione in laboratorio

- L'utilizzo va pianificato (programmazione della attività di campionamento e dell'invio dei campioni, rispetto della tempistica)
- Il test necessita di accuratezza nell'esecuzione dell'analisi
- Il test risente della fluttuazione della composizione quali-quantitativa delle Johnine PPD

DIAGNOSI DI PARATUBERCOLOSI BOVINA



PERCENTUALI DI POSITIVITA' ALLA COLTURA FECALE E/O AL TEST ELISA RELATIVE A 142 BOVINE INFETTE



87 BOVINE (61.3%) ERANO REATTIVE AL MOMENTO DEL TEST

Collins, 2001

DIAGNOSI: CONCLUSIONI

- Non esiste un test in grado di individuare con certezza l'infezione in ogni sua fase evolutiva
- Il valore individuale dei test è basso soprattutto in fase di infezione iniziale
- Il test va scelto in funzione dell'obiettivo (diagnostica, risanamento, certificazione)
- Si può ovviare alla mancanza di sensibilità di un test ripetendo il test od associando più test
- I laboratori devono fornire dati quantitativi (ELISA S/P) o semiquantitativi (CF) utilizzabili, basati su valutazioni su larga scala con i quali poter gestire i problemi in allevamento