***LA PARATUBERCOLOSI: 5 ANNI DOPO***
***Roma, 1 dicembre 2007***

# Il latte come potenziale veicolo di *Mybacterium avium* subsp.*paratuberculosis:* implicazioni epidemiologiche e diagnostiche

**Norma Arrigoni**

**IZSLER - Centro di Referenza Nazionale della Paratubercolosi – Sez. di Piacenza**

# Aspetti di sanità pubblica

Esiste un link
tra il morbo di Crohn
dell’uomo e la
paratubercolosi?

# Associazione tra CD e MAP

Meta-analisi di 18 studi caso-controllo di pazienti CD vs. controlli, mediante PCR nei tessuti o nel sangue

**OR osservati: 0,04-31,5**

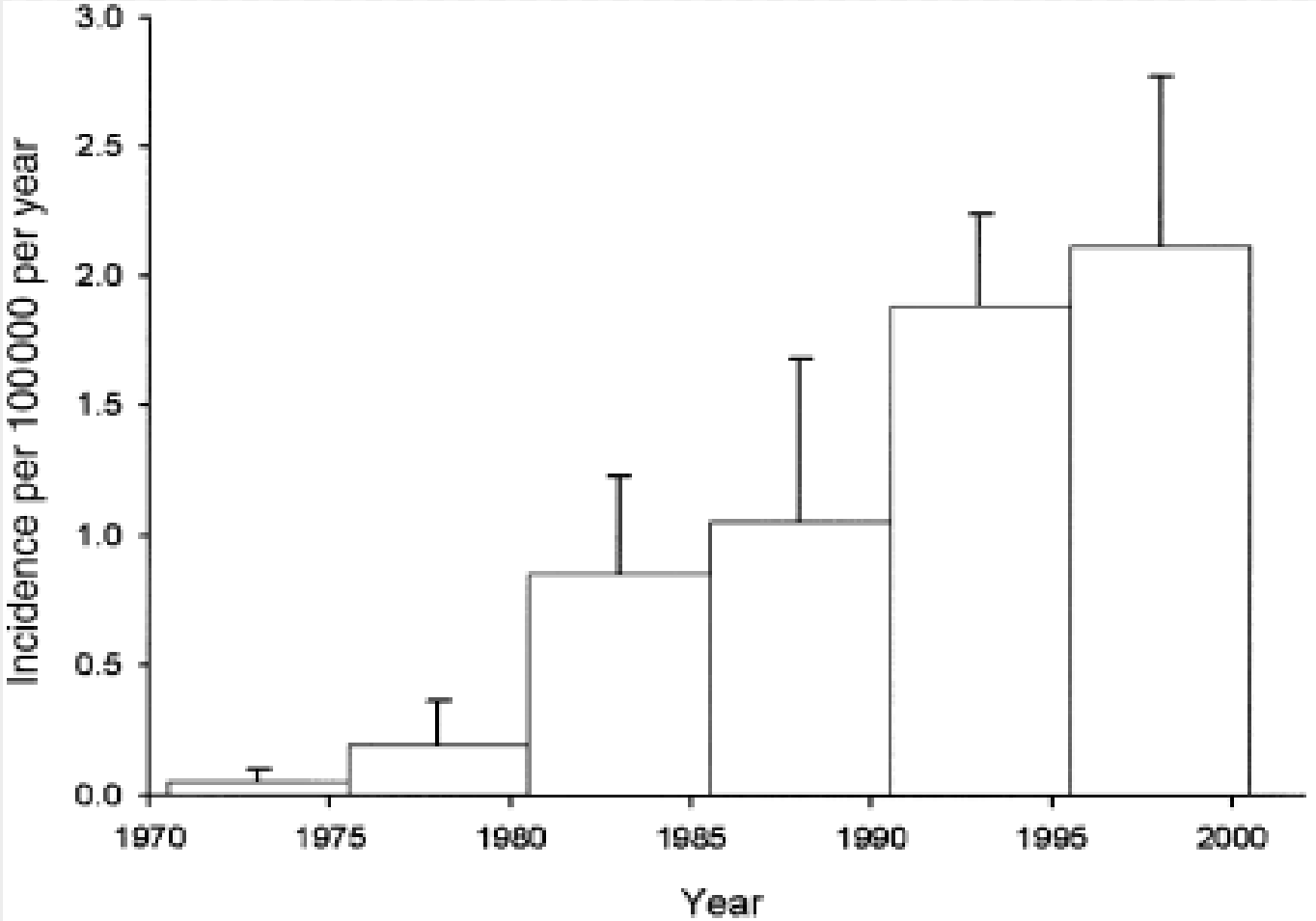
**OR medio: 7,01** (3,95-12,94)

Feller et Al.(2007):*Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* and Crohn's disease: a systematic review and meta-analysis. http://infection.thelancet.com 2007, 7

# Possibile ruolo di Map

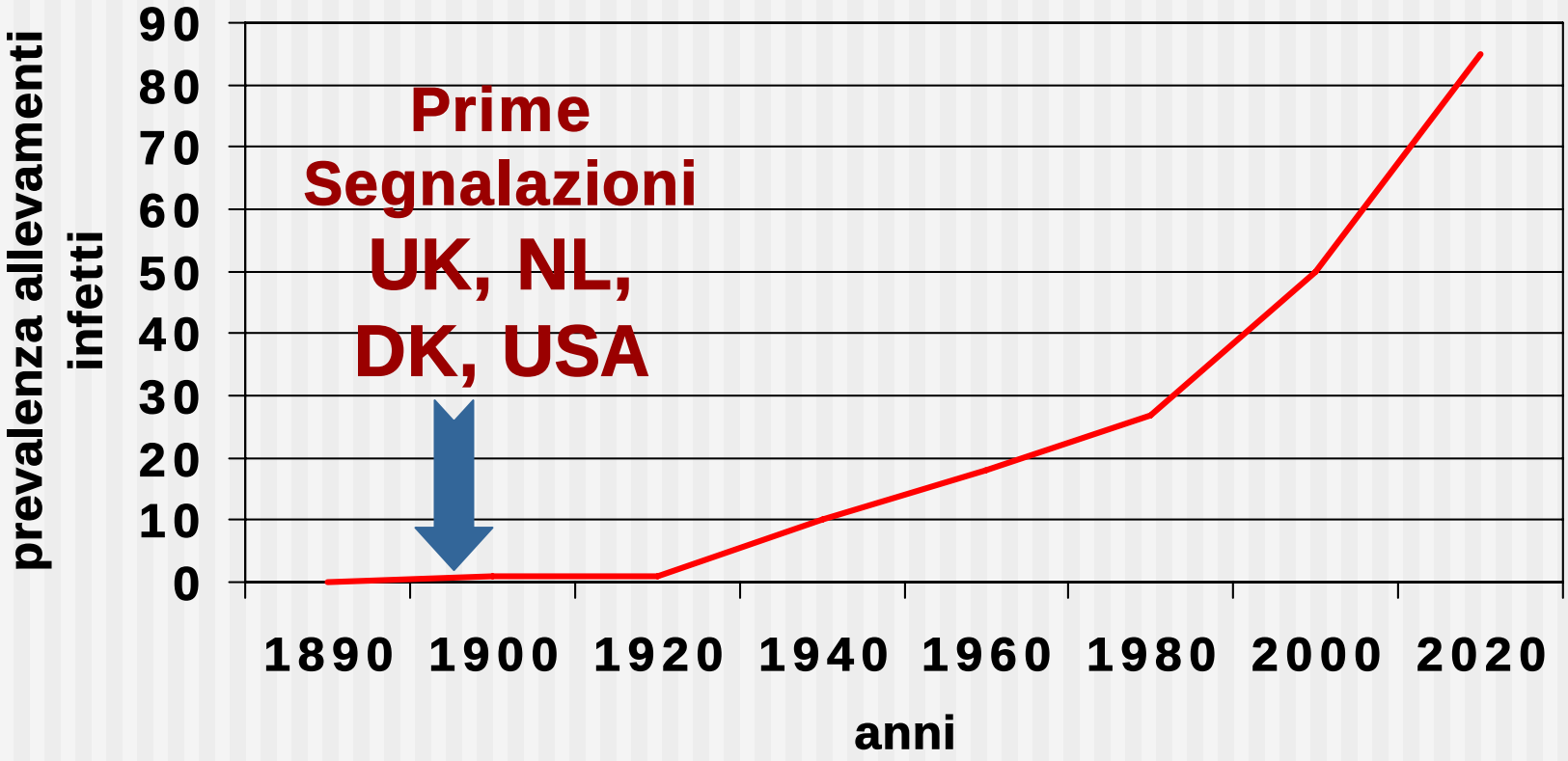
- Agente causale
- Agente scatenante in pazienti predisposti
- Commensale

# Increasing incidence of Crohn's disease in Victorian children



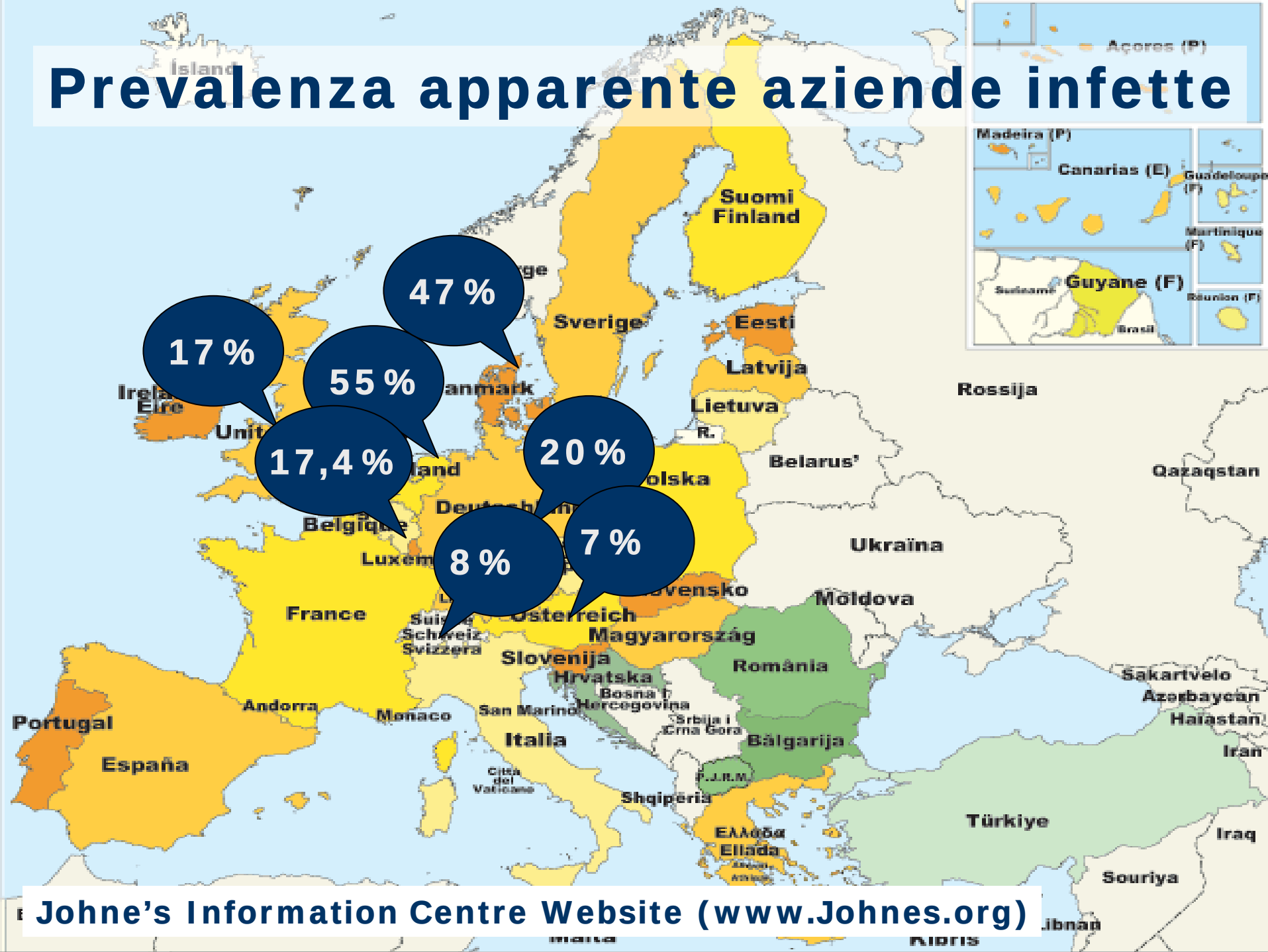

**Phavichitr N. et al., J.Gastroenterol. Hepatol. (2003): 18, 329-332**

# Paratubercolosi: diffusione




Collins M., 2001

# Prevalenza apparente aziende infette




Johne's Information Centre Website (www.Johnes.org)

# Indagini effettuate in Italia sulla Paratubercolosi Bovina

| Area geografica | Anno indagine | Metodo diagnostico | % allevamenti positivi | % capi positivi |
|---|---|---|---|---|
| **Sicilia** | 1989 | ELISA | 12,40% | 1,47% |
| **Prov. Brescia** | 1989 | FdC | 60,3% | 9,9% |
| | | EC | 1,7% | 0,13% |
| **Prov. Lodi** | 1989 | ELISA+EC | 14,8% | - |
| **Prov. Piacenza** | 1991 | EC | - | 2,1% |
| **Veneto** | 2000/01 | ELISA | 64,9% (26,7%) | 3,5% |
| **Lazio** | 2004 | ELISA | 42,0% | 2,4% |
| **Lombardia** | 2003/04 | ELISA+EC | 43,7% (19,2%) | 2,6% |

# Come può avvenire la trasmissione di *Map* all'uomo?

- ✓ **per via diretta**
  - Animali - Uomo
- ✓ **per via alimentare**
  - Latte e derivati
  - Carni
  - Acqua

# *Map* nel latte

- ***Map* può contaminare il latte crudo? SI**

Giese et al., 2000
Stabel et al., 2002
Ayele et al., 2005
Pillai et al., 2002
Mahler et al., 2004
Grant et al., 2002
O'Reilly et al., 2004

- **Origine della contaminazione:**
  - **endogena ed esogena**

- **Entità media della contaminazione:**
  - **4-20 CFU/ml (Ayele et al, 2005)**
  - **<100 CFU/ml (Giese et al., 2005)**

# Contaminazione da Map nel latte: studi

***Bovine con forma clinica***

**54% (PCR+coltura)** **Giese e coll. (2000)**

***Bovine con forma subclinica***

**11.6% (coltura)**

**8,3% (coltura)** **Prelievo sterile**

**84% (PCR+coltura)** **Routine di mungitura**

RegioneLombardia
*Agricoltura*

## Progetto di ricerca in campo agricolo 2003-2005
## Assessorato Agricoltura - Regione Lombardia

# "Indagine sulla presenza di infezione da *Mycobacterium avium* subs. *paratuberculosis* in allevamenti di bovine da latte e analisi del rischio sulla presenza dell'agente infettivo nel latte crudo a livello di produzione primaria"

# Obbiettivo 2:

## Conoscere la % di aziende infette produttrici di latte contaminato da MAP mediante coltura e PCR

# 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**

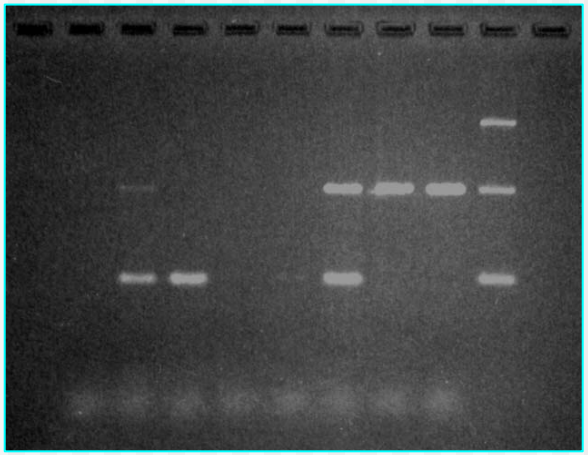
**lisi meccanico/chimica**

**(kit commerciale)**

**Nested PCR (in house)**

# Ricerca Map dal latte: tecniche utilizzate

**IN CONDIZIONI SPERIMENTALI:**



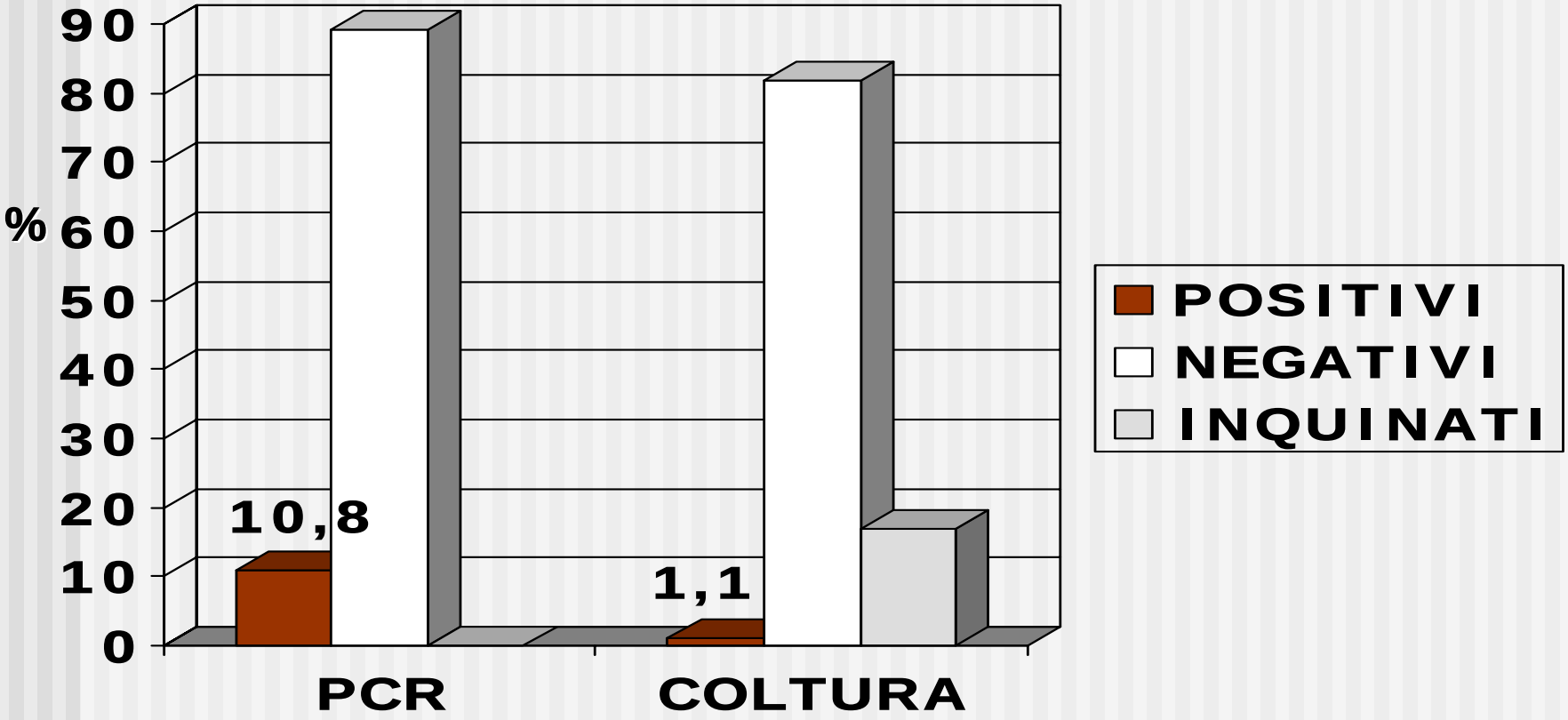
PCR
Limite di rilevabilità:
10-100 u.f.c./ml

Coltura
Limite di rilevabilità:
1-10 u.f.c./ml

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

## 183 campioni prelevati da 52 aziende

### Distribuzione percentuale degli esiti



# 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%** (I.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

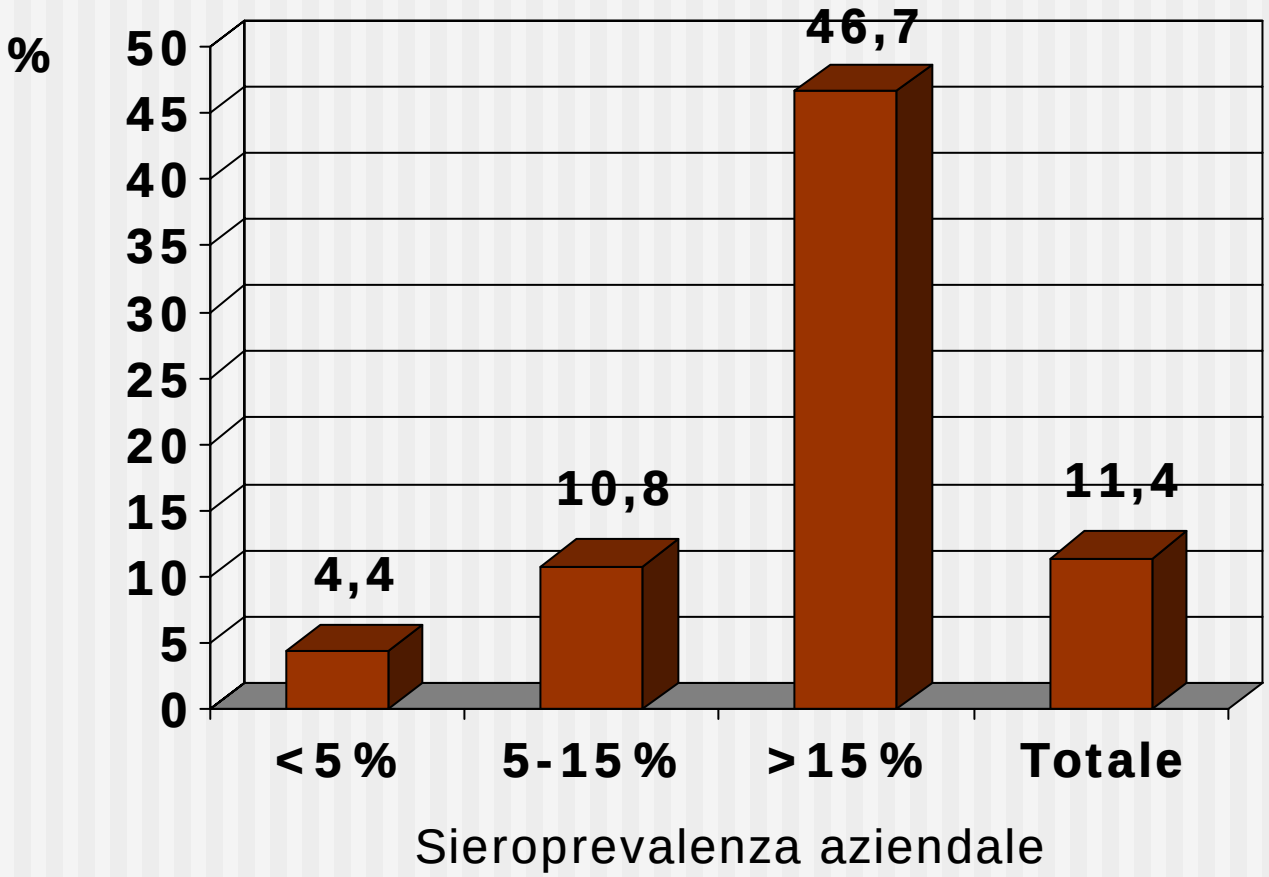
- **false negatività**
- **limitata sensibilità del metodo diagnostico**
- **precauzioni prelievo e conservazione campioni**

# PCR dal latte di massa: Considerazioni

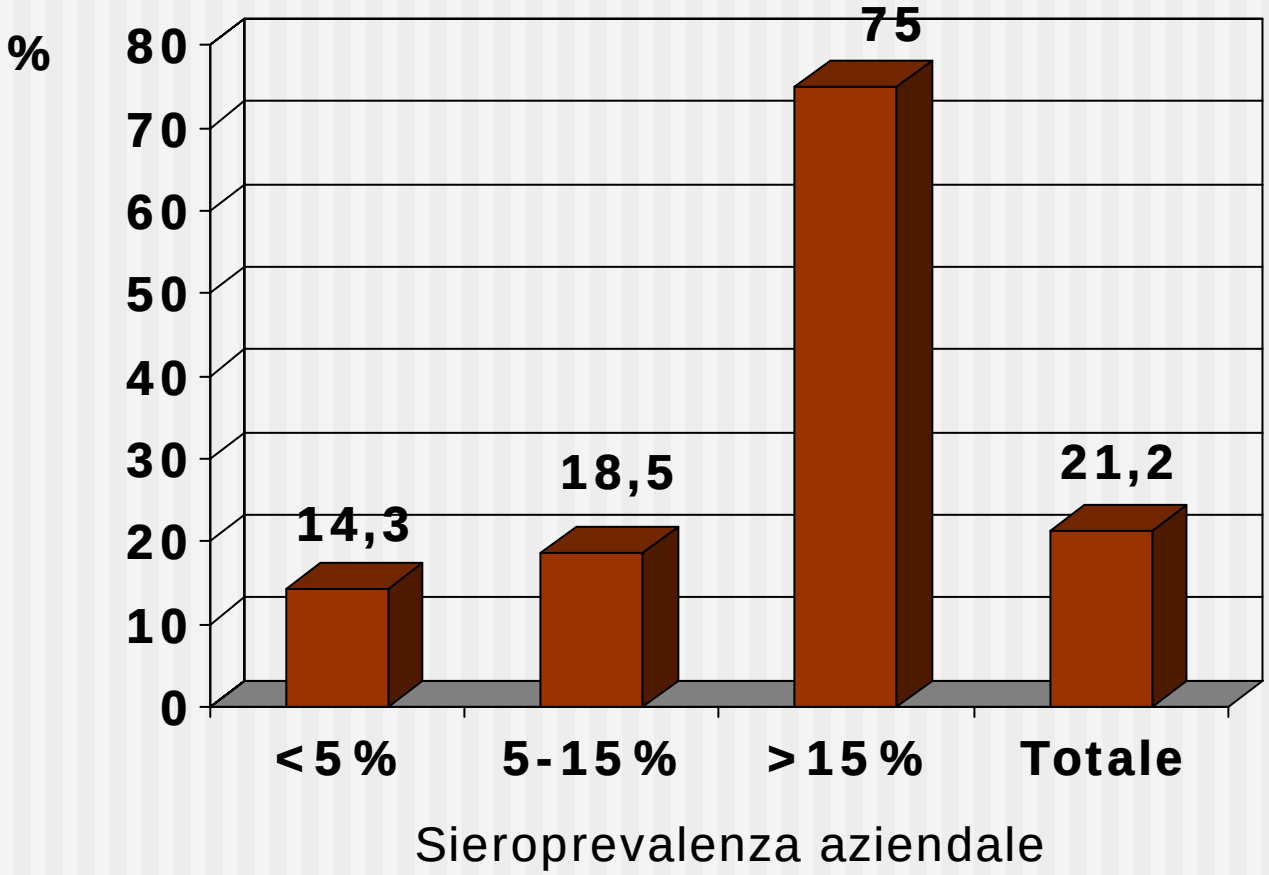
***Vantaggi:***
più rapida e più sensibile rispetto al test colturale (10,8% vs. 1,1% dei campioni provenienti da aziende infette)

***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

# % 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



# Aspetti di sicurezza alimentare

**I trattamenti tecnologici durante la manipolazione degli alimenti sono dei CCP?**

# Tempo (sec) necessario per distruggere 100% *Map* nel latte in funzione della concentrazione iniziale

| | 62°C | 65 °C | 68 °C | 71 °C |
|---|---|---|---|---|
| $10^6$ | 1373 | 287 | 131 | 70 |
| $10^5$ | 1144 | 239 | 109 | 59 |
| $10^4$ | 915 | 191 | 87 | 47 |
| $10^3$ | 686 | 143 | 66 | 35 |
| $10^2$ | 458 | 96 | 44 | 23 |
| $10^1$ | 229 | 48 | 22 | 11 |

Sung e Collins, 1998

# Map: studi di sopravvivenza su latte pastorizzato HTST

| | Vol (ml) testato | Rilevata Presenza Map | Decontaminazione |
|---|---|---|---|
| Grant,2002,2005. UK | 50 | SI | Nessuna, HPC |
| Hammer,2002. D | 50-100 | SI | Nessuna |
| Pearce, 2001. NZ | 50 | NO | HPC per 50 min |
| McDonald, 2005. AUS | 1500 | SI | HPC |
| Ayele,2005. CZ | 50 | SI | HPC |
| Rademaker, 2007 NE | 40 | NO | HPC |

**Riduzione di 4-7 log con la pastorizzazione**
**Il rischio è fx del livello di contaminazione iniziale**

# Map: studi di sorveglianza su latte pastorizzato in commercio

| | N° campioni | PCR + | Coltura + | Decontaminazione |
|---|---|---|---|---|
| Grant 2002 UK | 567 | 67 (12%) | 10 (2%) | HPC |
| Gao 2002 CAN | 710 | 110 (15%) | 0 | HPC |
| O' Reilly 2004 IRE | 357 | 35 (10%) | 0 | HPC |
| Elligson 2005 USA | 762 | 452 (59%) | 20 (3%) | Nessuna |
| Ayele 2005 CZ | 244 | - | 4 (2%) | HPC |
| Paolicchi 2005 ARG | 70 | 2 (3%) | 2 (3%) | HPC |

# *Map* resiste alla pastorizzazione HTST

## Possibili soluzioni:

- Aumentare il tempo (> 15 sec)?
- Aumentare la temperatura (>72 °C)?

# Termoresistenza di *Map*

**In condizioni sperimentali e a concentrazioni di $10^6$/ml:**

- **non resiste a 72°C per 25 sec**
- **resiste fino a 90 °C per 15 sec**

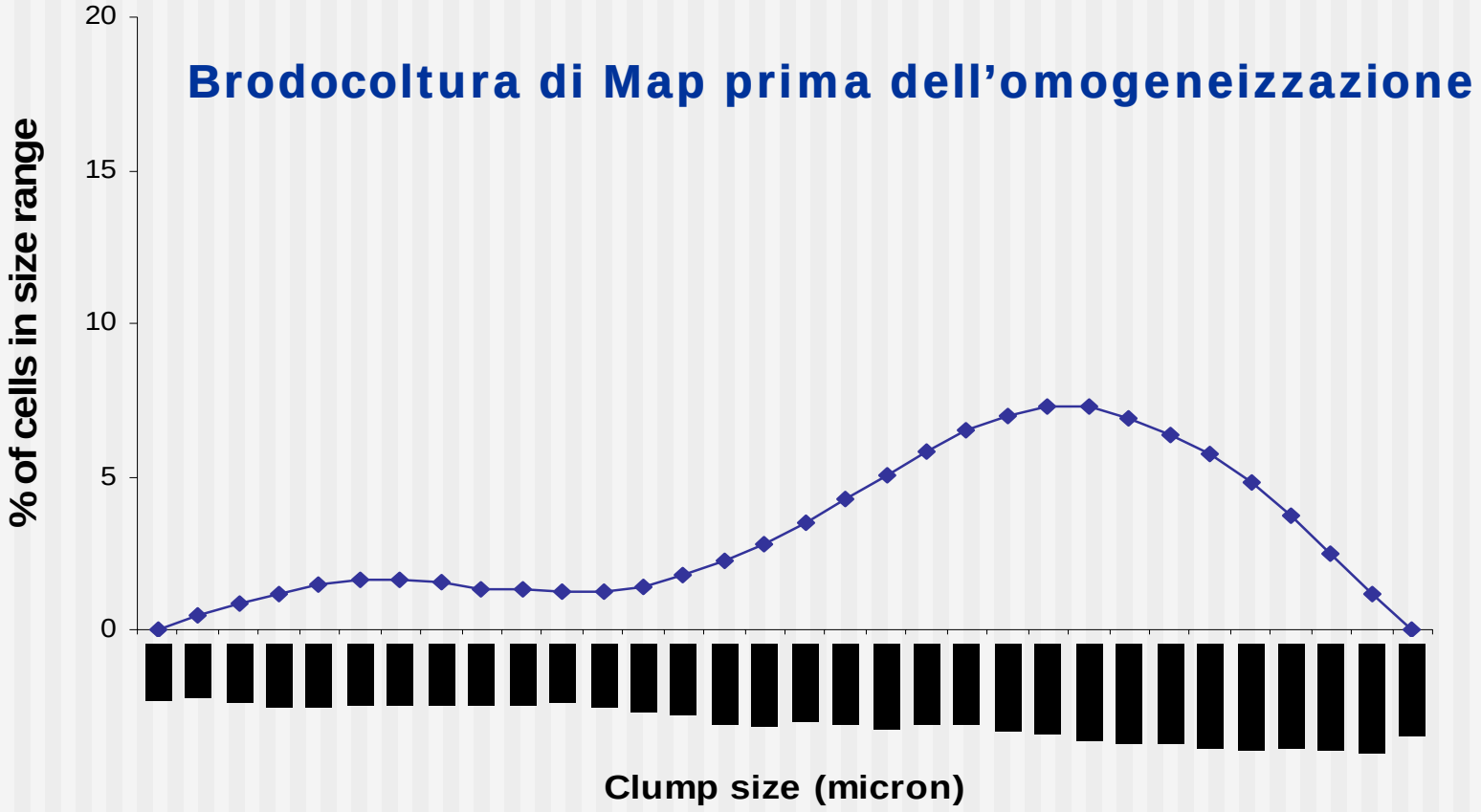
Grant, 1999

# Termoresistenza e omogeneizzazione

**In condizioni naturali resiste a 73°C per 15 e 25 sec** (Grant, 2002)

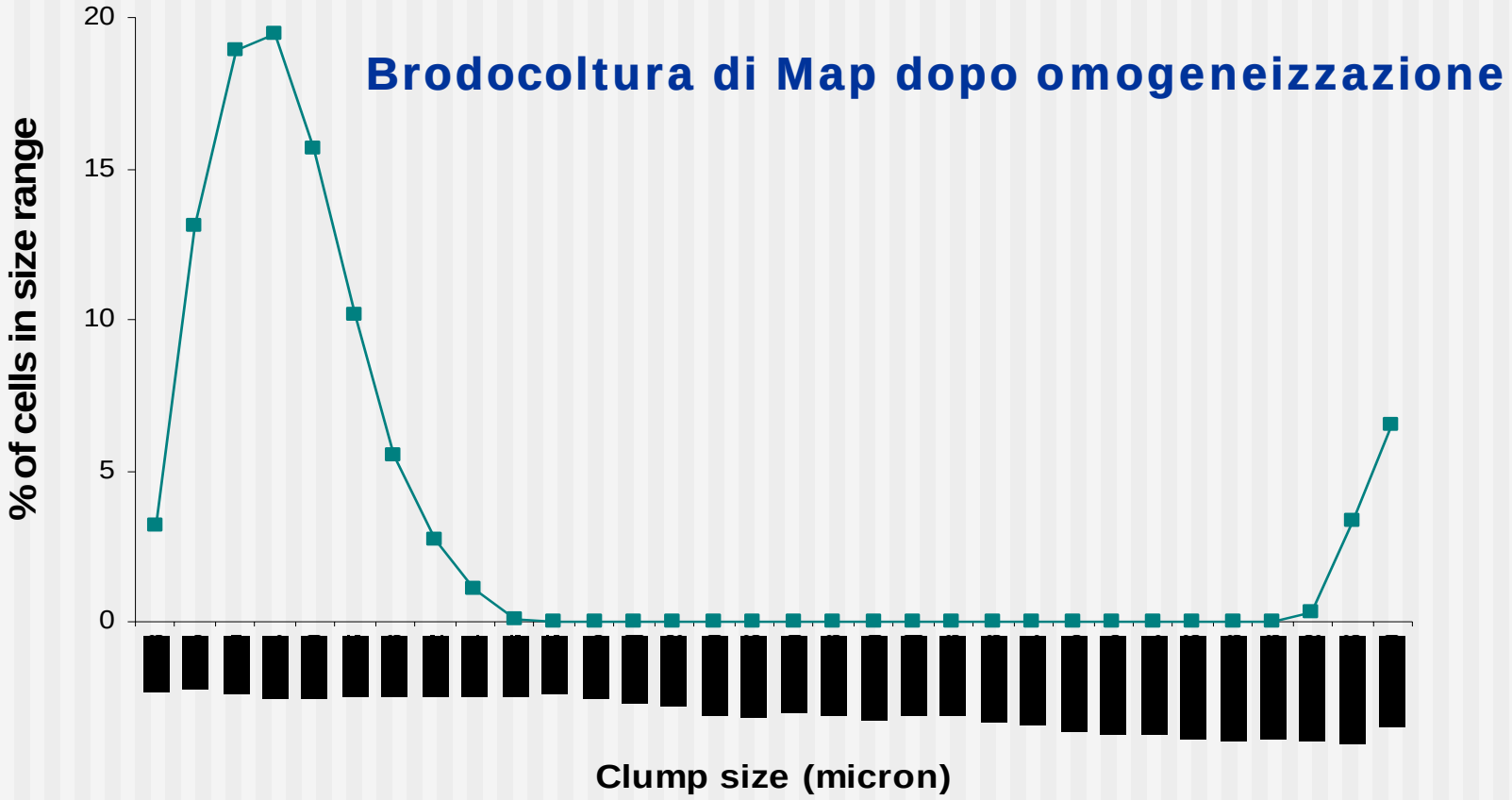
**L'omogeneizzazione aumenta l'efficacia, seppur parziale, della pastorizzazione, purchè applicata contestualmente al trattamento termico** (Grant, 2005)

# Effetto dell'omogeneizzazione su *MAP*



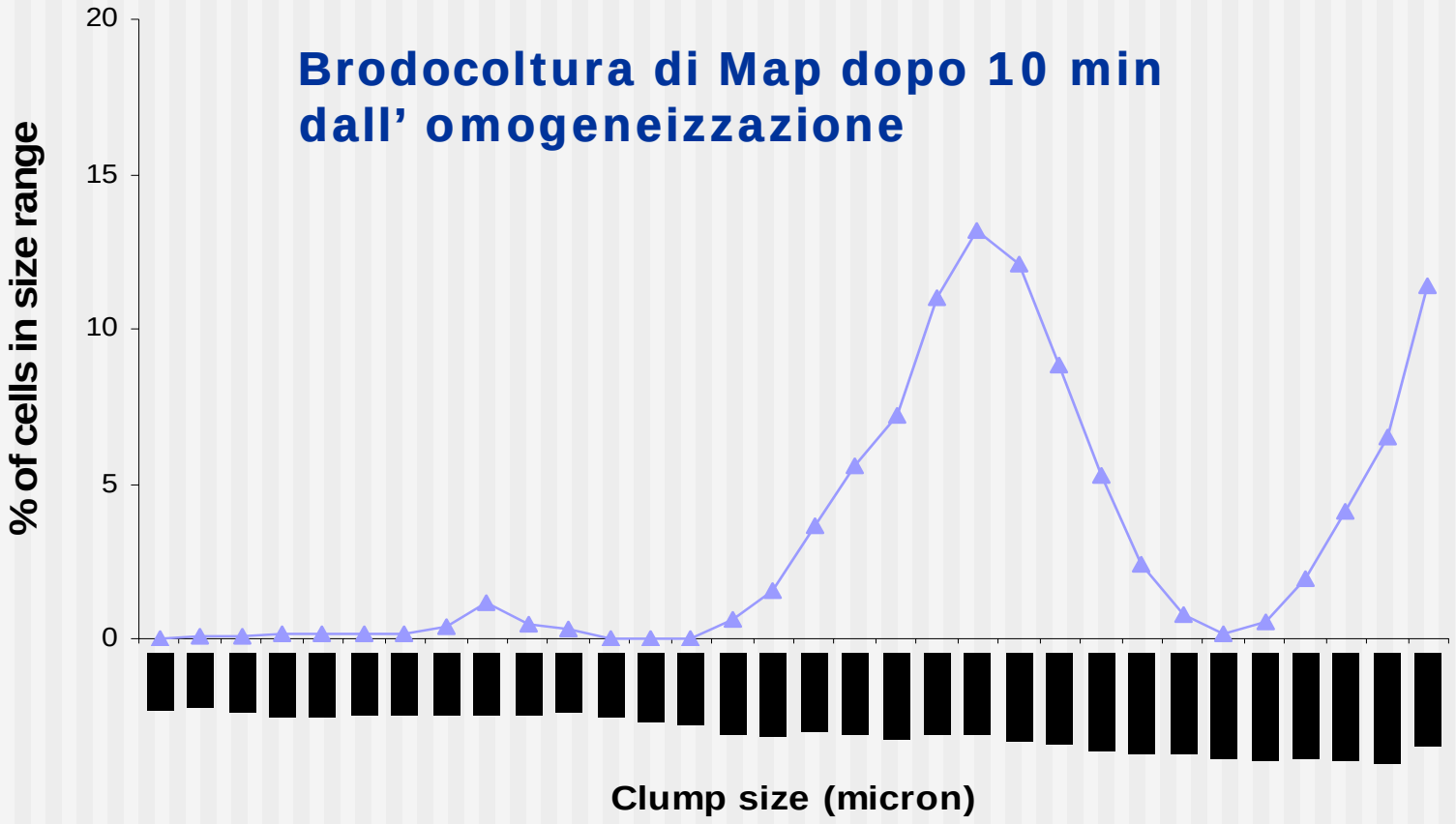

Grant et al. 2005

# Effetto dell'omogeneizzazione su *MAP*




Grant et al. 2005

# Effetto dell'omogeneizzazione su *MAP*




Grant et al. 2005

# Termoresistenza: possibili spiegazioni

- **Tendenza al clumping?**
- **Localizzazione intracellulare?**
- **Termoattivazione?**

**Map cresce più rapidamente se il latte è trattato a 100°C per 10 min** *(Herman L. et all. 8° ICP)*

# Centrifugazione

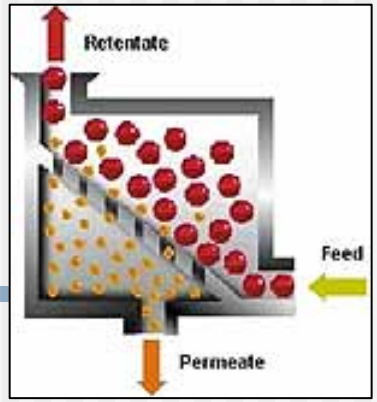
**7000 X g per 10 sec dopo riscaldamento a 60 °C**

| Riduzione Media $Log_{10}$ Map | |
|---|---|
| Clumped: | 3,05-3,56 |
| Declumped: | 3,33-3,98 |

| Riduzione Media % Map | |
|---|---|
| Clumped: | 99,82-99,95 |
| Declumped: | 99,92-99,98 |

**Grant et all, 2005 Int.J.Dai.Techn.**

# Microfiltrazione




**Attraverso porosità 1,2 µm**

**Riduzione Media $Log_{10}$ Map: 1,3-3,4**

**Riduzione Media % Map: 94,6-99,9**

**Grant et all, 2005 Int.J.Dai.Techn.**

# Trattamento alta Pressione

**A Pressione di 500 Mpa per 10 min:**

**Riduzione Media $Log_{10}$ Map: 6,52**

**A Pressione di 600 Mpa per 5 min + HTST:**

**Riesce a restistere !!**

**Donaghy et al., (2007): Lett. Appl.Microb. 45, 154-159**

# Trattamento con UV

**Map è più R agli effetti dei raggi UV degli altri batteri**

**Alla dose di 1000 mJ/ml (DOSE LIMITE):**

**Riduzione Media $Log_{10}$ Map: 0,5-1**

**Altic LC, et al., (2007): Appl.Env.Microb. 73, 11, 3728-3733**

# Variabili degli studi sperimentali

- **Concentrazione**
- **Ceppo utilizzato**
- **Fase di moltiplicazione**

# E nel formaggio?

**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, sono necessari 140 gg (duri), 230 gg (semiduri), 300 gg (freschi) per ottenere livelli di Map non rilevabili in coltura

Sung e Collins, 2000
Spahr e Schafroth, 2002

# Indagini sulla presenza di *Map* nei derivati del latte in commercio

***Formaggi***

**50% formaggio Feta (Grecia) e 12% di formaggi duri e semiduri (Repubblica Ceca) erano positivi a IS900-PCR, 3.6% del totale positivi a *MAP* in coltura**

(Gazouli et al. 2003)

***Latte in polvere per la prima infanzia***

**25/51 (49%) dei campioni di 10 differenti marche provenienti da 7 paesi europei sono risultati positivi a IS900-PCR, 1/51 (1.9%) è risultato positivo in coltura**

(Hruska et al. 8ICP, 2005)

# Pericolo di Map nelle acque

**Map resiste 55 settimane al riparo della luce**

**Contaminazione prati e pascoli**

**Contaminazione acque superficiali**

# Ecologia di Map

- 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**

**La clorazione, alle concentrazioni utilizzate di routine, provoca una riduzione di 2 Log10**
**(Whan 2001)**

# Presenza di Map nelle acque

***Pericolo di contaminazione per:***

- ingestione diretta
- contaminazione della catena alimentare
- inalazione

# Presenza di *Map* nelle carni

***Il rischio teorico esiste in quanto:***

- **bovini a diverso stadio di infezione (anche subclinico) possono avere infezioni disseminate a linfonodi, sangue e visceri**
- **durante la macinatura l'infezione, se localizzata, può essere disseminata a tutto il lotto di carne**

**Le vacche da latte a fine carriera sono ad alto rischio**

# Sicurezza alimentare e Map

*L’allevamento è il punto critico di controllo*

# **OBIETTIVO 4:** definire i punti critici in allevamento determinanti per la contaminazione del latte

## *Scheda di rilevazione dati aziende infette*

**STIMA PREVALENZA**

| Num. capi di età superiore a 12 mesi presenti | Num. capi di età superiore a 12 mesi esaminati | Num. capi di età superiore a 12 mesi positivi |
|---|---|---|
| | | |

**INCIDENZA CASI CLINICI**

| | |
|---|---|
| Nessun caso clinico | |
| Casi clinici < 2 % all'anno | |
| Casi clinici compresi tra 2 e 5 % all'anno | |
| Casi clinici > 5 % all'anno | |

**FREQUENZA INSORGENZA CASI CLINICI PER CLASSI DI ETA'**

| Età all'insorgenza dei sintomi | Frequenza dell'insorgenza | | |
|---|---|---|---|
| | Nessun caso | Casi Sporadici | Casi Frequenti |
| <2 Anni | | | |
| 2-3 Anni | | | |
| >3 Anni | | | |

# **OBIETTIVO 4:** definire i punti critici in allevamento determinanti per la contaminazione del latte

## *Scheda di rilevazione dati aziende infette*

**STATO IGIENICO DELLA LETTIERA**

| | |
|---|---|
| Buono | |
| Discreto | |
| Scadente | |
| Molto scadente | |
| Tipo di lettiera : paglia | |

**STATO IGIENICO DELLA MAMMELLA**

| | |
|---|---|
| mammelle molto sporche / umide | |
| mammelle moderatamente sporche | |
| mammelle lievemente sporche / secche | |
| mammelle pulite | |

**TIPO DI MUNGITURA**

| | |
|---|---|
| alla posta con mungitrice a secchio o a carrello o bidoni in stalla | |
| alla posta con lattodotto | |
| In sala di mungitura | |
| In sala di mungitura a pettine | |

# **OBIETTIVO 4:** definire i punti critici in allevamento determinanti per la contaminazione del latte

## *Scheda di rilevazione dati aziende infette*

**IGIENE' IMPIANTO MUNGITURA E FRIGORIFERO**

| | |
|---|---|
| ottima (MG carica batterica <50.000) | |
| buona (MG carica batterica 50.000-100.000) | |
| scadente (MG carica batterica 100.000-300.000) | X |
| molto scadente (MG carica batterica >300.000) | |
| Non disponibile (valutare andamento ultimi esiti disponibili) | |

**IGIENE DELLA MUNGITURA**

| | |
|---|---|
| pulizia con stracci o spugne riutilizzati più volte | |
| lavaggio con acqua senza asciugatura | |
| nessun intervento di preparazione/pulizia | |
| pulizia a secco con carta a perdere | |
| lavaggio con acqua e asciugatura con carta a perdere | X |
| fazzolettini con disinfettante senza asciugatura | |
| fazzolettini con disinfettante e asciugatura con carta a perdere | |

**FILTRAZIONE DEL LATTE**

| | |
|---|---|
| non viene eseguita / uso scorretto dei filtri | |
| viene eseguita con filtri cambiati occasionalmente/ settimanalmene | |
| viene eseguita con filtri cambiati giornalmente o ad ogni mungitura | X |

**CADENZA RITIRO LATTE**

| | |
|---|---|
| Ogni mungitura | X |
| Ogni 2 mungitura | |
| Ogni 4 mungiture | |
| > 4 mungiture | |

# Rilevazione dati anamnestici in rapporto alla contaminazione del latte

**In tutto sono state raccolte e analizzate le schede relative a 49 allevamenti infetti da paratubercolosi, di cui 11 produttori di latte contaminato.**
**In 3 casi non è stato possibile avere a disposizione i dati.**

# Presenza sintomatologia in 49 aziende infette in Lombardia

## Sintomi clinici:

**nel 42,1% delle aziende produttrici di latte non contaminato**
**nel 72,7% delle aziende produttrici di latte contaminato**

## Incidenza annua casi clinici:

**<2% nel 97,4% delle aziende produttrici di latte non contaminato**
**>2% nel 54,6% delle aziende produttrici di latte contaminato**
**Tutte le aziende con incidenza >5% producono latte contaminato**

## Incidenza annua casi clinici in animali giovani:

**Tutte le aziende risultano produttrici di latte contaminato**

## Stato igienico della lettiera in 49 aziende infette

| Valutazione dell'igiene della lettiera | Latte contaminato | % | Latte non contaminato | % |
|---|---|---|---|---|
| Buono | 3 | 27,3 | 9 | 23,7 |
| Discreto | 7 | 63,6 | 27 | 71,1 |
| Scadente | 1 | 9,1 | 2 | 5,3 |
| Molto scadente | 0 | 0,0 | 0 | 0,0 |
| Totale | 11 | 100 | 38 | 100 |

**Generalmente lo stato igienico delle lettiere è stato valutato come Buono o Discreto. Non emergono differenze tra le aziende produttrici di latte contaminato e non contaminato.**

# Stato igienico della mammella in 49 aziende infette

| Stato igienico delle mammelle | Latte contaminato | % | Latte non contaminato | % |
|---|---|---|---|---|
| Molto sporche / umide | 1 | 9,1 | 0 | 0,0 |
| Moderatamente sporche | 3 | 27,3 | 5 | 13,2 |
| Lievemente sporche | 2 | 18,2 | 19 | 50,0 |
| Pulite | 5 | 45,5 | 14 | 36,8 |
| Totale | 11 | 100 | 38 | 100 |

**La percentuale delle aziende con mammelle sporche (da moderatamente a molto) è superiore nelle aziende produttrici di latte contaminato**

# Tipo di mungitura in 52 aziende infette in Lombardia

| Tipo di mungitura | Latte contaminato | % | Latte non contaminato | % |
|---|---|---|---|---|
| Alla posta, mungitrice a secchio, a carrello, bidoni in stalla | 0 | 0,0 | 2 | 5,3 |
| Alla posta con lattodotto | 0 | 0,0 | 7 | 18,4 |
| In sala di mungitura | 5 | 45,5 | 24 | 63,2 |
| In sala di mungitura a pettine | 6 | 54,5 | 4 | 10,5 |
| Non riportato | 0 | 0,0 | 1 | 2,6 |
| Totale | 11 | 100 | 38 | 100 |

**Non emergono differenze tra le aziende produttrici di latte contaminato e non contaminato**

# Igiene impianto di mungitura e frigorifero in 52 aziende infette

| Valutazione igiene di impianto di mungitura e frigorifero | Latte contaminato | % | Latte non contaminato | % |
|---|---|---|---|---|
| Ottima (MG < 50.000) | 10 | 90,9 | 27 | 71,1 |
| Buona (MG 50.000-100.000) | 1 | 9,1 | 8 | 21,1 |
| Scadente (MG 100.000-300.000) | 0 | 0,0 | 0 | 0,0 |
| Molto scadente (MG > 300.000) | 0 | 0,0 | 0 | 0,0 |
| Non indicato | 0 | 0,0 | 3 | 7,9 |
| Totale | 11 | 100 | 38 | 100 |

**Il valore di carica batterica non può essere considerato un fattore indicativo di contaminazione del latte da parte di Map**

# Igiene della mungitura in 52 aziende infette

| Pulizia della mammella | Latte contaminato | % | Latte non contaminato | % |
|---|---|---|---|---|
| Stracci / spugne riutilizzati più volte | 1 | 9,1 | 4 | 10,5 |
| Acqua senza asciugatura | 1 | 9,1 | 2 | 5,3 |
| Nessun intervento di preparazione / pulizia | 1 | 9,1 | 5 | 13,2 |
| A secco con carta a perdere | 2 | 18,2 | 10 | 36,3 |
| Acqua e carta a perdere | 1 | 9,1 | 8 | 21,1 |
| Fazzolettini con disinfettante senza asciugatura | 0 | 0,0 | 1 | 2,6 |
| Fazzolettini con disinfettante e asciugatura con carta a perdere | 5 | 45,5 | 7 | 18,4 |
| Non indicato | 0 | 0,0 | 1 | 2,6 |
| Totale | 11 | 100 | 38 | 100 |

**Non emergono differenze tra le aziende produttrici di latte contaminato e non contaminato**

# Filtrazione del latte in 52 aziende infette

| Filtrazione del latte | Latte contaminato | % | Latte non contaminato | % |
|---|---|---|---|---|
| Non eseguita / uso scorretto filtri | 1 | 9,1 | 2 | 5,3 |
| Eseguita con filtri cambiati occasionalmente / settimanalmente | 0 | 0,0 | 0 | 0,0 |
| Eseguita con filtri cambiati giornalmente o ad ogni mungitura | 10 | 90,9 | 35 | 92,1 |
| Non riportato | 0 | 0,0 | 1 | 2,6 |
| Totale | 11 | 100 | 38 | 100 |

**Nella quasi totalità delle aziende la filtrazione avviene in maniera ottimale, sia tra le aziende produttrici di latte contaminato che non contaminato.**

# Map può contaminare il latte con probabilità crescente in funzione di:

**prevalenza d'infezione in allevamento**

(***Indicatori*** *: sieroprevalenza, alta incidenza di casi clinici e loro comparsa in animali giovani)*

**contaminazione fecale**

(***Indicatori****: stato igienico delle mammelle)*

***Né l'applicazione di ottimali norme igieniche in fase di mungitura, né la corretta filtrazione del latte sono efficaci nel limitare la presenza di Map nel latte***

# Interventi per limitare la presenza di Map nel latte

- ridurre la prevalenza d'infezione (eliminare soprattutto i soggetti forti eliminatori)
- applicare rigorose misure igieniche, volte a scongiurare il pericolo di contaminazione fecale del latte (ricerca coliformi)

# Possibile rapporto tra CD e Paratubercolosi ?

*CEE Report Comitato Scientifico sulla Salute e sul Benessere Animale (21.3.2000):*

…“Sono necessari ulteriori studi per chiarire questo importante quesito”…..

…”Indipendentemente dal possibile ruolo di Map nel Morbo di Crohn, l’applicazione di ogni mezzo volto ad eradicare la Paratubercolosi dall’allevamento animale deve costituire una priorità”…

# Possibile rapporto tra CD e Paratubercolosi ?

*Report UK Food Standard Agency (gen.2002):*

…“Abbiamo un potenziale patogeno per l’uomo nei ruminanti e in altri animali d’allevamento. L’esposizione della popolazione umana è in probabile aumento. In attesa di ulteriori chiarimenti riguardo la patogenicità per l’uomo, è comunque necessario, in via precauzionale, applicare tutte le misure necessarie a ridurre l’esposizione dell’uomo”…

# Prospettive

- Certificare gli allevamenti indenni
- Applicare piani di controllo dell'infezione negli allevamenti infetti
- Inserire la ricerca di Map nei piani di autocontrollo delle aziende da latte non certificate