

IL PIANO REGIONALE DI CONTROLLO DELLA BRUCELLOSI BOVINA DELL'EMILIA-ROMAGNA

ANALISI DEI PRIMI RISULTATI

MARCO TAMBA ⁽¹⁾ - IVANO MASSIRIO ⁽²⁾ - ANNALISA SANTI ⁽²⁾ - LUISA LOLI PICCOLOMINI ⁽²⁾

⁽¹⁾ ISTITUTO ZOOPROFILATTICO SPERIMENTALE DELLA LOMBARDIA ED EMILIA-ROMAGNA - SEZIONE DI BOLOGNA

⁽²⁾ REGIONE EMILIA-ROMAGNA. SERVIZIO VETERINARIO E IGIENE DEGLI ALIMENTI

La brucellosi bovina è una malattia infettiva ad eziologia batterica, sostenuta di norma da *Brucella abortus*; il bovino però si può naturalmente infettare anche con *Brucella melitensis* e *Brucella suis*. La brucellosi bovina è una zoonosi, per tale motivo in Italia è oggetto di piani di controllo mirati dalla seconda metà degli anni sessanta. Attualmente su tutto il territorio nazionale è in vigore un piano di eradicazione obbligatorio (D.M. 651/1994), basato essenzialmente sul controllo sierologico periodico della popolazione bovina e sulla eliminazione dei capi sieropositivi. Attraverso la puntuale applicazione di questo piano, la regione Emilia-Romagna ha raggiunto nel 2002 l'eradicazione di *Brucella abortus* dal territorio regionale, ottenendo così il riconoscimento di territorio ufficialmente indenne da brucellosi bovina da parte della Commissione europea (Dec. 2003/164/Ce del 10/03/03).

Con lo scopo di mantenere la qualifica sanitaria raggiunta e di razionalizzare l'impiego di risorse umane, finanziarie e strumentali, l'Emilia-Romagna ha quindi emanato al termine del mese di gennaio 2003 un proprio piano di controllo, in applicazione del D.Lgs. 196/1999, incentrato in particolar modo sulla sorveglianza delle situazioni a rischio.

Il piano regionale di controllo, infatti, focalizza la sua attenzione su (1) il controllo batteriologico sugli aborti, ribadendo l'obbligo

della denuncia e incentivando l'invio dei feti al laboratorio; (2) il controllo della movimentazione, introducendo il controllo sierologico a destino sugli animali provenienti da fuori Regione o transitati da stalle di sosta. Per aumentarne la sensibilità inoltre, tale controllo sierologico prevede l'esecuzione e l'interpretazione in parallelo sia della siero-agglutinazione rapida (SAR), sia della fissazione del complemento (FdC); (3) il controllo sulla identificazione e sulla registrazione dei movimenti dei bovini (anagrafe bovina).

In tale contesto la prova sierologica annuale di stalla, cardine del piano nazionale di eradicazione, viene ad assumere il valore di verifica dei risultati dell'attività di sorveglianza. Nel piano regionale tale controllo viene sostituito, dove possibile, da un controllo sierologico quadrimestrale mediante ELISA sul latte di massa (ELISA-L); una tipologia di controllo da tempo validata ed utilizzata in altri Paesi (Giovannini e coll. 1997, Nielsen e coll. 1996, Vanzini e coll. 1998).

In considerazione del fatto che anche in un territorio libero da infezione sono comunque attese sieropositività, dovute alla imperfetta specificità ($Sp < 100\%$) dei test impiegati nelle indagini sierologiche (Godfroid e coll., 2002), il piano di controllo regionale prevede inoltre che in tutti gli allevamenti con positi-

RIASSUNTO

Nel 2003 la regione Emilia-Romagna ha attivato un piano di controllo della brucellosi bovina basato sulla sorveglianza delle situazioni a rischio (principalmente aborti e movimentazioni di animali). Il piano prevede inoltre il controllo del latte di massa, mediante ELISA, per la valutazione dello stato sanitario degli allevamenti. Rispetto allo stesso periodo del 2002, nel primo semestre di applicazione del piano sono aumentati i controlli sugli animali in compravendita e la percentuale di allevamenti e capi controllati. In particolare il test ELISA sul latte di massa ha dimostrato di avere una buona specificità (>99,7%) ed una sensibilità sufficiente ad individuare precocemente gli allevamenti infetti. La possibilità di esaminare in poco tempo un gran numero ►

ANIMALI DA REDDITO

◀ di allevamenti con il latte di massa, infatti, ha permesso di controllare rapidamente un'inattesa epidemia dovuta a *Brucella melitensis* biotipo 3, connessa al movimento e al commercio illegale di greggi ovi-caprini infetti.

PAROLE CHIAVE

Brucellosi bovina, ELISA, latte di massa, piano di controllo, sorveglianza

TAB. 1 - CONFRONTO TRA GLI ESAMI EFFETTUATI SUGLI ANIMALI IN COMPRAVENDITA IN EMILIA-ROMAGNA NEL PRIMO SEMESTRE 2002 E 2003

Tecnica	2002 (1 gennaio - 30 giugno)			2003 (1 gennaio - 30 giugno)			Differenza esami 2002/03
	n. campioni esaminati	n. campioni positivi	% positività	n. campioni esaminati	n. campioni positivi	% positività	
SAR	796	1	0,13%	12.040	14	0,12%	+1413%
FdC	9.657	7	0,07%	16.255	4	0,02%	+68%

vità sierologiche vengano eseguite l'indagine epidemiologica e specifiche procedure diagnostiche per la conferma della presenza di infezione.

Nella presente nota vengono riportati i risultati dell'attività di sorveglianza sierologica nei primi sei mesi di applicazione del piano, al fine di permettere una prima valutazione sul suo andamento.

METODOLOGIA

- **Fonti dei dati.** I dati sull'attività di sorveglianza (report semestrali; segnalazioni di focolaio/sospetto focolaio; indagini epidemiologiche) nei confronti della brucellosi bovina sono stati forniti dai Servizi veterinari delle Aziende Usl della regione Emilia-Romagna. I dati relativi alle tipologie dei test sierologici eseguiti e dei relativi risultati sono stati estratti dal Sistema informativo dell'Istituto zooprofilattico sperimentale della Lombardia

e dell'Emilia-Romagna di Brescia.

- **Prove di laboratorio impiegate nel piano.** Per i controlli sierologici individuali sono stati utilizzati la siero-agglutinazione rapida (SAR) e la fissazione del complemento (FdC), eseguite e interpretate secondo il protocollo riportato sul piano nazionale di eradicazione (D.M. 651/1994). Per il controllo sierologico sul latte di massa è stata impiegata un'ELISA indiretta reperita sul mercato (Svanovir™ *Brucella*-Ab I-ELISA), utilizzando la metodica ed i criteri di interpretazione forniti dalla ditta produttrice.

RISULTATI

- **Controlli sulle movimentazioni.** Durante il primo semestre 2003 sono stati eseguiti oltre 16.000 controlli su bovini in compravendita (tabella 1). Rispetto allo stesso periodo del 2002 è stato registrato un aumento di tale attività del 68%. Questo aumento indica

TAB. 2 - CONFRONTO TRA L'ATTIVITÀ DI SORVEGLIANZA SVOLTA IN EMILIA-ROMAGNA NEL PRIMO SEMESTRE 2002 E 2003

Patrimonio e attività	2002 (1 gennaio - 30 giugno)	2003 (1 gennaio - 30 giugno)	Differenza 2002/03
N. totale aziende	13.284	12.596	-5,2%
N. aziende soggette al programma	10.988	10.237	-6,8%
N. di aziende controllate	4.993	7.867	+57,6%
N. di aziende positive	1	16	+1500%
N. di nuove aziende positive	1	16	+1500%
% aziende controllate	45,4%	76,8%	+69,1%
% aziende positive (prevalenza)	0,02%	0,20%	+915%
% nuove aziende positive (incidenza)	0,02%	0,20%	+915%
N. totale degli animali	565.238	642.846	+13,7%
N. totale degli animali da esaminare nel programma	456.291	451.948	-1,0%
N. degli animali controllati	213.163	425.013	+99,4%
N. degli animali controllati individualmente	213.163	70.817	-66,8%
N. di animali positivi	1	354	35300%
N. totale di animali abbattuti	0	1.403	n.c.
% animali controllati	46,7%	94,0%	-101%
% animali positivi (prevalenza)	0,00%	0,08%	+17655%

TAB. 3 - CONFRONTO TRA GLI ESAMI EFFETTUATI PER I CONTROLLI DI STALLA IN EMILIA-ROMAGNA NEL PRIMO SEMESTRE 2002 E 2003

Tecnica	2002 (1 gennaio - 30 giugno)			2003 (1 gennaio - 30 giugno)			Differenza esami 2002/03
	n. campioni esaminati	n. campioni positivi	% positività	n. campioni esaminati	n. campioni positivi	% positività	
SAR	187.201	118	0,06%	39.168	571	1,46%	-79%
FdC	337	8	2,37%	2.402	288	11,99%	+613%
ELISA-L	-	-	-	5.918	39	0,66%	n.c.
Totale	187.538			47.488			-75%

che è stata rispettata la disposizione contenuta nel piano di sorveglianza di sottoporre a ricontrollo gli animali introdotti da fuori regione o transitati da stalla di sosta. Dall'analisi della tabella risulta inoltre che in seguito all'emanazione del piano (febbraio 2003) sui capi in compravendita viene costantemente eseguita anche la SAR.

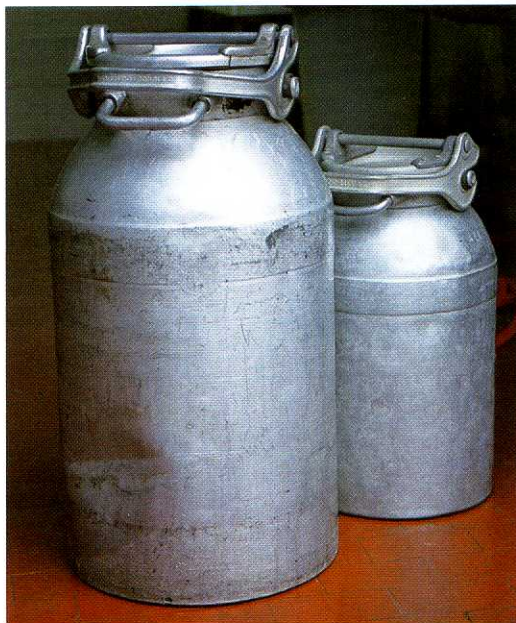
La percentuale di positività riscontrata in questo tipo di controllo è risultata molto bassa (SAR: 0,12%; FdC: 0,02%) e compatibile con i livelli di specificità delle prove diagnostiche impiegate. Durante il primo semestre 2003 nessun focolaio è stato individuato mediante il controllo sugli animali in movimentazione e tutte le positività evidenziate sono state attribuite a reazioni aspecifiche.

- **Controlli sugli allevamenti.** L'introduzione del saggio sul latte di massa ha permesso di aumentare l'attività di sorveglianza sierologica nei confronti della brucellosi. Al termine del primo semestre 2003, infatti risultavano già essere stati controllati almeno una volta

7.867 allevamenti e 425.013 capi, pari rispettivamente al 76,8% e al 94,0% del patrimonio soggetto al piano (tabella 2). Rispetto allo stesso periodo dell'anno precedente è stato registrato un incremento significativo della percentuale sia di allevamenti (+69%) che di capi controllati (+99%). Al significativo aumento dell'attività di controllo è corrisposta una complessiva diminuzione delle prove di laboratorio (tabella 3). In particolare risultano essere diminuite le SAR (-148.000 prove); nello stesso periodo è stato invece registrato un aumento delle FdC eseguite. Questo fenomeno è principalmente legato all'incidenza di aziende positive, aumentata di dieci volte rispetto all'anno precedente. Nel primo semestre del 2003, infatti, sono state rilevate 16 aziende con 354 capi positivi, mentre nello stesso periodo del 2002 era stata rilevata solamente un'azienda con un unico capo positivo (tabella 2).

- **Indagini sulle positività riscontrate.** In seguito al rilievo di 16 aziende con capi positivi alla FdC, nel primo semestre 2003 sono stati segnalati complessivamente 12 focolai e 5 sospetti focolai di brucellosi bovina. La classificazione in focolai (aziende con positività da infezione) e in sospetti focolai (aziende con positività da probabili reazioni aspecifiche) è stata attribuita dai Servizi veterinari delle Aziende Usl sulla base dei riscontri sierologici, batteriologici ed epidemiologici, seguendo le procedure previste dal piano regionale di controllo. I dati principali su questi allevamenti sono stati riassunti in tabella 4.

Le indagini epidemiologiche effettuate in tutti i focolai hanno rilevato contatti indiretti con ovi-caprini infetti in 9 casi, mentre in un caso l'unico animale risultato positivo era di recente introduzione (il capo infetto era risultato negativo alla prova sierologica effettuata prima dello spostamento, così come i restanti capi dell'azienda di origine). In 9 focolai è stata isolata *Brucella* sp., tipizzata dal Centro Nazionale di Referenza di Teramo come *Brucella melitensis* biotipo 3. In 8 focolai infine il risanamento è stato effettuato tramite abbattimento totale.



L'introduzione del saggio sul latte di massa ha anche permesso di aumentare l'attività di sorveglianza sierologica

SUMMARY

In 2003 the Emilia-Romagna Region has implemented a program to control Bovine brucellosis, based on disease risk factors (mainly abortions and animal movements) surveillance.

Furthermore, to evaluate the herd health status, quarterly bulk milk ELISA tests have been performed. With respect to the same period of 2002, in the first six months of program enforcement both controls on purchased cattle and percentage of herds and heads controlled increased, while total number of tests performed decreased. Bulk milk ELISA shows good specificity (>99.7%) and sensitivity able to early detect infected herds. In fact, capability to control many herds in few time by bulk milk ELISA allowed the rapid extinction of an unexpected epidemic due to *Brucella melitensis* biovar 3, linked to illegal movements and purchasing of sheep and goats infected flocks.

KEY WORDS

Bovine brucellosis, bulk milk, control program, ELISA, surveillance
Fig. 1 - Distribuzione dei titoli in FdC nei capi sieropositivi dei focolai e dei sospetti focolai di brucellosi bovina in Emilia-Romagna nel periodo gennaio-giugno 2003

- **Stima della specificità dell'ELISA sul latte di massa.** Nel primo semestre 2003 sono stati esaminati 5.918 campioni di latte di massa, 39 dei quali (0,66%) con esito positivo in ELISA. I successivi controlli sierologici individuali effettuati nelle stalle di provenienza dei campioni positivi hanno dato risultati completamente negativi in 13 aziende (13 campioni di latte positivi); mentre in altre 17 aziende (26 campioni di latte positivi) sono state rilevate sieropositività alla SAR e/o alla FdC.

Le indagini sierologiche, batteriologiche ed epidemiologiche svolte negli allevamenti con sieropositività in ottemperanza al piano di sorveglianza, infine, hanno attribuito le sieropositività ad infezione in 11 aziende (19 campioni di latte positivi), mentre in altre 6 aziende (7 campioni di latte positivi) le sieropositività individuali sono state ascritte a reazioni aspecifiche (tabella 5).

Sulla base di questi risultati la specificità assoluta dell'ELISA sul latte di massa è stata stimata intorno al 99,7%; prendendo invece come riferimento la presenza in azienda di capi positivi alla FdC, la specificità ha mostrato valori leggermente superiori, intorno al 99,8%. I valori riscontrati concordano con quanto dichiarato dalla ditta produttrice del test (specificità dichiarata > 99%) e riportato in letteratura (Biancifiori e coll. 1997, Nielsen e coll. 1996).

- **Stima della sensibilità dell'ELISA sul latte di massa.** Nelle 30 aziende indagate perché positive all'ELISA eseguita sul latte di massa nel primo semestre 2003, le prove sierologiche individuali effettuate sui capi superiori ad un anno di età hanno rilevato sieropositività alla SAR e/o alla FdC in 17 casi. In tabella 5 sono riassunti i quadri risultanti dai

Continua a pag. 14 ►

TAB. 4 - DATI RIEPILOGATIVI SUI FOCOLAI E SOSPETTI FOCOLAI DI BRUCELLOSI BOVINA SEGNALATI IN EMILIA-ROMAGNA NEL PERIODO GENNAIO-GIUGNO 2003

N.	Focolaio/Sospetto	Provincia	Indirizzo produttivo	Data ultimo controllo negativo	Data segnalaz	Tipo di controllo	Capi presenti	Capi posit.
1	Focolaio	Reggio E.	Latte	16/10/02 S	26/04/03	Latte di massa	356	106
2	Focolaio	Reggio E.	Latte	27/02/02 S	02/05/03	Latte di massa	427	89
3	Focolaio	Parma	Latte	18/06/02 S	07/05/03	Latte di massa	279	56
4	Focolaio	Parma	Latte	13/06/02 S	07/05/03	Latte di massa	87	31
5	Focolaio	Parma	Latte	29/08/02 S	07/05/03	Latte di massa	55	9
6	Focolaio	Reggio E.	Latte	09/10/02 S	08/05/03	Latte di massa	205	3
7	Focolaio	Parma	Riprod. carne	08/10/02	S 15/05/03	Controllo sierologico di stalla	15	3
8	Focolaio	Reggio E.	Latte	22/11/02 S	28/05/03	Latte di massa	150	1
9	Focolaio	Reggio E.	Latte	07/06/02 S 08/04/03 L	12/06/03	Latte di massa	129	6
10	Focolaio	Parma	Latte	19/02/02 S 09/04/03 L	13/06/03	Latte di massa	182	29
11	Focolaio	Parma	Manze	19/02/02 S	13/06/03	Correlazione epidemiologica con foc.10	75	0
12	Focolaio	Reggio E.	Latte	10/12/02 S 8/04/03 L	17/06/03	Latte di massa	118	15
13	Sospetto	Piacenza	Latte	29/01/02 S	27/01/03	Controllo sierologico di stalla	311	1
14	Sospetto	Ferrara	Riprod. carne	05/12/02 S	24/03/03	Controllo capi in compravendita	326	1
15	Sospetto	Parma	Latte	16/09/02 S	07/05/03	Latte di massa	76	1
16	Sospetto	Parma	Latte	17/07/02 S	15/05/03	Latte di massa	87	1
17	Sospetto	Modena	Latte	10/07/02 S 18/04/03 L	26/06/03	Controllo capi in compravendita	402	1

S = Controllo sierologico su tutti i capi di età superiore a 12 mesi

L = Controllo sierologico sul latte di massa

TAB. 5 - PROSPETTO DELLE AZIENDE DELL'EMILIA-ROMAGNA CON SIEROPOSITIVITÀ ALLE PROVE INDIVIDUALI ESEGUITE IN SEGUITO AL RISCONTRO DI POSITIVITÀ DEL LATTE DI MASSA NEL PRIMO SEMESTRE 2003

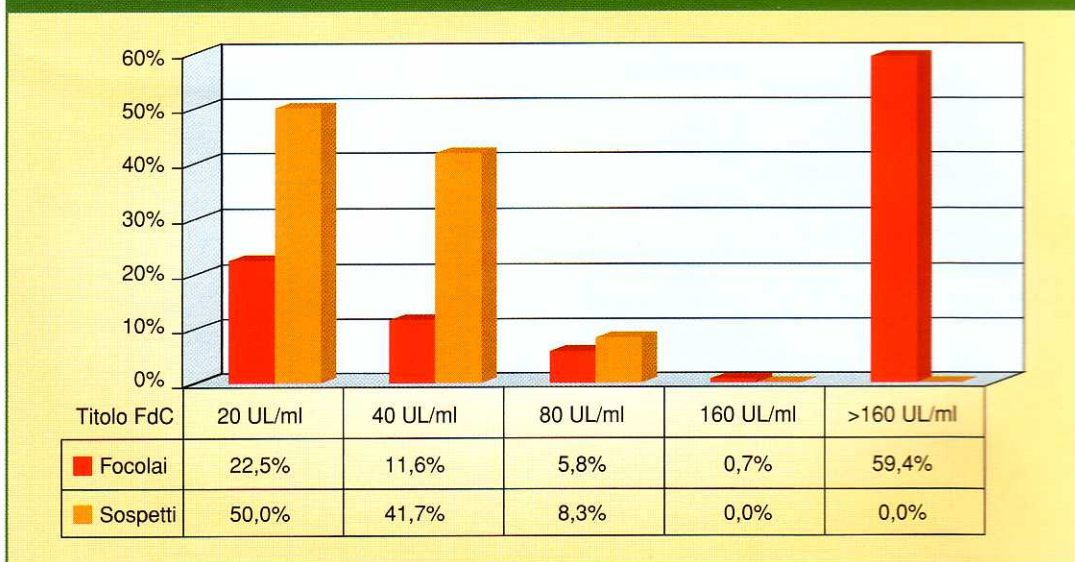
Tipo positività	Provincia	Capi esaminati	Capi SAR+	Capi FdC+	% pos. SAR	% ps. FdC	Prove batteriologiche sui capi FdC+
Positività da infezione	Reggio E.	178	4	2	2,2%	1,1%	B.melitensis 3
	Reggio E.	350	85	53	24,3%	15,1%	B.melitensis 3
	Reggio E.	305	105	77	34,4%	25,2%	B.melitensis 3
	Reggio E.	126	3	1	2,4%	0,8%	B.melitensis 3
	Reggio E.	109	6	4	5,5%	3,7%	Negative
	Reggio E.	104	15	9	14,4%	8,7%	B.melitensis 3
	Parma	239	110	56	46,0%	23,4%	B.melitensis 3
	Parma	67	50	31	74,6%	46,3%	B.melitensis 3
	Parma	62	2	1	3,2%	1,6%	Negative
	Parma	147	60	29	40,8%	19,7%	B.melitensis 3
	Parma	48	14	9	29,2%	18,8%	B.melitensis 3
Positività da reazioni aspecifiche	Bologna	231	20	2	8,7%	0,9%	n.e.
	Modena	34	2	2	5,9%	5,9%	n.e.
	Modena	20	1	0	5,0%	0,0%	n.e.
	Parma	75	15	1	20,0%	1,3%	Negative
	Parma	107	2	0	1,9%	0,0%	n.e.
	Reggio E.	35	1	1	2,9%	2,9%	Negative

◀ Segue da pag. 12

controlli sierologici individuali effettuati in queste aziende. Dall'analisi della tabella si può notare che la prova sul latte è risultata positiva anche in presenza di percentuali di positività alla FdC intorno all'1%; molto pro-

tabilmente però il risultato dell'ELISA viene influenzato dal titolo anticorpale dei capi positivi, risultato mediamente molto più alto quando la positività è da attribuire ad infezione da brucellosi (figura 1). Il latte è risultato

▶ Continua a pag. 16

FIG. 1 - DISTRIBUZIONE DEI TITOLI IN FdC NEI CAPI SIEROPOSITIVI DEI FOCOLAI E DEI SOSPETTI FOCOLAI DI BRUCELLOSI BOVINA IN EMILIA-ROMAGNA NEL PERIODO GENNAIO-GIUGNO 2003


L'applicazione del nuovo piano di controllo regionale ha consentito un risparmio sulle risorse impiegate per la sorveglianza della brucellosi bovina



◀ Segue da pag. 14

positivo in ELISA anche quando in azienda erano presenti alte percentuali (>5%) di capi positivi alla SAR.

DISCUSSIONE

I primi risultati dell'applicazione del nuovo piano di controllo regionale appaiono incoraggianti. Il sistema, infatti, già dai primi mesi di applicazione sembra aver raggiunto l'obiettivo di permettere un risparmio sulle risorse impiegate per la sorveglianza della malattia, soprattutto per quanto riguarda il numero delle prove di laboratorio.

Il programma di controllo, finalizzato essenzialmente alla conferma della sostanziale indennità del patrimonio bovino si è dimostrato efficace anche nella rilevazione di situazioni "anomale". In particolare, la prova sul latte ha permesso l'individuazione precoce di aziende infette da *B. melitensis* ed il controllo in tempi brevi di tutte le aziende bovine delle aree in cui i greggi vaganti infetti hanno pascolato. Tutto ciò ha portato a circoscrivere abbastanza rapidamente l'epidemia. Non va infatti taciuto il fatto che, se in una tale situazione epidemiologica si fosse continuato con i controlli sierologici annuali, si sarebbe probabilmente verificato uno stilloccidio di focolai durante tutto l'anno solare (diversi focolai avevano la prova annuale programmata verso la fine dell'anno), e le indagini epidemiologiche svolte a così tanta distanza dal momento dell'infezione non avrebbero avuto la medesima efficacia. Oltre ai focolai bovini, infatti, sono stati individuati nello stesso periodo 6 focolai di brucellosi ovicaprina (3 in provincia di Parma, 2 in provincia di Reggio Emilia e uno in provincia di Bologna), tutti correlati tra loro da scambi illegali di animali.

L'applicazione puntuale di procedure volte alla conferma dei focolai, infine, oltre a permettere una più corretta distinzione tra aziende realmente infette e false positività, ha permesso di attribuire l'epidemia all'introduzione

recente e illegale in regione di un gregge infetto da *B. melitensis* biotipo 3, ceppo mai isolato prima in Emilia-Romagna. Questo riscontro dovrebbe quindi permettere alla regione Emilia-Romagna di mantenere l'indennità da *B. abortus* appena acquisita.

CONCLUSIONI

I risultati dei primi sei mesi di applicazione del piano di controllo della brucellosi bovina sono incoraggianti. L'attività di controllo è aumentata, pur diminuendo il numero assoluto delle prove di laboratorio eseguite.

Il sistema di controlli attivati in Emilia-Romagna, ha inoltre permesso l'individuazione, la gestione ed il controllo di una inaspettata epidemia da *B. melitensis* che, se da una parte ha permesso la validazione del sistema attivato, dall'altra non dovrebbe annullare i risultati sanitari fin qui conseguiti. Le procedure diagnostiche connesse al piano infatti mostrano di possedere una sensibilità e specificità sufficiente a testimoniare la sostanziale assenza di *B. abortus* dal territorio della Regione.

BIBLIOGRAFIA

- Biancifiori E., Giovannini A., Di Matteo A., Urbani G., Nannini D. (1997) - Standardizzazione di una tecnica ELISA per la ricerca degli anticorpi brucellari nel latte bovino. *Vet. Italiana*, 32 (22): 42-46.
- Giovannini A., Biancifiori E., Di Matteo A., Nannini D. (1997) - Valutazione di un test ELISA-Latte mediante studio nel tempo di un focolaio di brucellosi bovina da *B. melitensis*. *Vet. Italiana*, 32 (22): 47-50.
- Godfroid J., Saegerman C., Wellemans V., Walravens K., Letesson J.J., Tibor A., McMillan A., Spencer S., Sanna M., Bakker D., Pouillot R., Garin-Bastuji B. (2002) - How to substantiate eradication of bovine brucellosis when specific serological reactions occur in the course of brucellosis testing. *Vet. Microbiol.*, 90: 461-477.
- Nielsen K., Smith P., Gall D., Perez B., Cosma C., Mueller P., Trotter J., Cote G., Boag L., Bosse J. (1996) - Development and validation of an indirect enzyme immunoassay of antibody to *Brucella abortus* in milk. *Vet. Microbiol.*, 52: 165-173.
- Vanzini V.R., Aguirre N., Lugaes C.I., de Echaide S.T., de Canavesio V.G., Guglielmo A.A., Marchesino M.D., Nielsen K. (1998) - Evaluation of an indirect ELISA for the diagnosis of bovine brucellosis in milk and serum samples in dairy cattle in Argentina. *Prev. Vet. Med.*, 36: 211-217.