

Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia-Romagna  
\*Centro di Referenza Nazionale per la Paratubercolosi - Sezione di Piacenza  
\*\*Centro Emiliano-Romagnolo Epidemiologia Veterinaria - Sezione di Bologna

## **DIAGNOSI DI PARATUBERCOLOSI BOVINA: SENSIBILITA' DEL TEST SIEROLOGICO ELISA DAL LATTE DI MASSA**

*Ricerca effettuata nell'ambito del progetto "Indagine sulla presenza di infezione da Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis in allevamenti di bovine da latte e analisi del rischio sulla presenza dell'agente infettivo nel latte crudo a livello di produzione primaria", finanziato dalla Regione Lombardia, Programma regionale della ricerca in campo agricolo 2001-2003, Piano per la ricerca e lo sviluppo 2003 (d.g.r. n.13077/2003)*

**Arrigoni N.(\*), Cammi G.(\*), Losini I.(\*), Taddei R.(\*), Tamba M.(\*\*), Belletti G.L.(\*)**

### **RIASSUNTO**

52 allevamenti di bovine da latte, con stato di infezione paratubercolare accertato mediante esame sierologico ELISA (Institut Pourquier) individuale, sono stati sottoposti a prelievo ripetuto di campioni di latte di massa. Dall'analisi di 183 campioni di latte di massa, mediante esame sierologico ELISA con lo stesso kit commerciale, il 30,1% dei campioni e il 40,4% delle aziende sono risultati reattivi (positivi o dubbi). La sensibilità appare fortemente correlata alla sieroprevalenza aziendale. Il campionamento ripetuto aumenta la sensibilità di questo strumento diagnostico.

### **SUMMARY**

#### *Diagnosis of bovine paratuberculosis: sensitivity of ELISA test on bulk milk*

52 dairy herds, in which paratuberculosis was diagnosed by serological ELISA test (Institut Pourquier) on individual samples, were submitted to repeated bulk milk sampling. Testing 183 bulk milk samples by the same ELISA commercial kit, 30,1% of samples and 40,4% of herds resulted reactive (positive or doubtful) to paratuberculosis. The sensitivity appears strongly correlated to the herd prevalence. The repeated sampling enhances the sensitivity of this diagnostic tool.

### **Introduzione**

La paratubercolosi, malattia infettiva e contagiosa sostenuta da *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*, è ampiamente diffusa su territorio europeo (IDF 2001) ed italiano, come testimoniano i dati di indagini effettuate in Veneto (Robbi e Coll. 2002), Lazio (Lillini e Coll. 2005) e Lombardia (Arrigoni e Coll. 2006).

Il test sierologico sul latte individuale ha fornito risultati promettenti nella diagnosi di paratubercolosi, con livelli di sensibilità solo di poco inferiori a quelli del test sul sangue (40% latte vs. 44% sangue)(Arrigoni e Coll. 2004).

I dati di specificità del test ELISA applicato al latte variano dal 99,4% su latte di massa (Van Maanen e Coll. 2005) al 100% su latte individuale (Arrigoni e Coll. 2004).

Scopo del lavoro è verificare il dato di sensibilità del test ELISA sul latte di massa di aziende infette con livello di sieroprevalenza noto, alla luce del fatto che l'indagine sierologica sul latte di massa è oggi ampiamente utilizzata come strumento a basso costo, nell'ambito di piani di sorveglianza epidemiologica e profilassi (Brucellosi, Leucosi Bovina Enzootica, IBR).

### **Materiali e metodi**

Nell'ambito di una indagine epidemiologica volta a definire la prevalenza delle aziende lombarde infette da Paratubercolosi, sono state individuate 52 aziende sicuramente infette (Arrigoni e Coll., 2006).

Le 52 aziende infette sono state sottoposte a campionamento ripetuto del latte di massa a distanza di almeno 30 giorni, allo scopo di campionare tutte le vacche in lattazione, per un totale di 183 campioni (3,5 campioni in media per azienda), che sono stati sottoposti ad analisi mediante kit ELISA del commercio (Institut Pourquier, Montpellier, France), validato per l'utilizzo specifico sul latte.

## **Risultati**

Nell'elaborazione dei dati, sono stati considerati "reattivi" sia i campioni positivi che dubbi (non conclusivi), secondo le modalità di calcolo proposte dalla ditta produttrice.

In totale sono risultati reattivi 55 campioni su 183 analizzati, pari al 30,1% dei campioni, così distribuiti:

- 8 campioni su 72 (11,1%) provenienti da aziende a bassa sieroprevalenza (<5%);
- 32 campioni su 95 (33,7%) provenienti da aziende a media sieroprevalenza (5-15%);
- 15 campioni su 16 (93,8%), provenienti da aziende ad alta sieroprevalenza (>15%).

Considerando le aziende, in totale hanno fatto registrare almeno un campione positivo 21 aziende su 52, pari al 40,4% delle aziende infette, così distribuite:

- 4 aziende su 21 (19,0%) a bassa sieroprevalenza (<5%);
- 13 aziende su 27 (48,1%) a media sieroprevalenza (5-15%);
- 4 aziende su 4 (100%) alta sieroprevalenza (>15%).

Delle 21 aziende infette, sono risultate positive:

- 7 aziende, su un solo campione;
- 6 aziende, su più di un campione ma non su tutti;
- 8 aziende, su tutti i campioni.

Delle 8 aziende positive su tutti i campioni, 3 sono ad elevata sieroprevalenza, 4 a media e 1 a bassa sieroprevalenza.

Delle 4 aziende ad alta prevalenza, la sola azienda che non ha reagito positivamente a tutti i campionamenti, aveva tre campioni reattivi e uno negativo.

La sensibilità del test ELISA su latte di massa è risultata in media pari al 30,1% (limiti fiduciali 95%: 27,5% - 37,3%). I valori di sensibilità possono essere aumentati attraverso il campionamento ripetuto delle aziende; mediante l'esame di più campioni successivi, infatti, è stato possibile rilevare il 40,4% delle aziende infette.

## **Discussione e conclusione**

Il test ELISA è un test rapido, economico e gestibile in grandi numeri dai laboratori; l'applicazione di questo test al latte di massa allo scopo di individuare gli allevamenti infetti ha inoltre il vantaggio di poter sfruttare gli stessi campionamenti effettuati per la diagnosi di Brucellosi e Leucosi, con un'ulteriore limitazione dei costi.

I dati del presente lavoro sono in linea con un analogo studio effettuato in Olanda mediante l'utilizzo dello stesso kit commerciale, dove la sensibilità media è risultata pari al 30% (Van Maanen e Coll. 2005).

Il risultato positivo dell'esame sierologico del latte di massa è risultato fortemente correlato alla sieroprevalenza aziendale, facendo ipotizzare un suo possibile utilizzo per individuare gli allevamenti ad alta prevalenza e quindi produttori di latte a maggior rischio di contaminazione.

Al contrario, la limitata sensibilità del test ELISA sul latte di massa, anche con campionamenti ripetuti, ne sconsiglia l'impiego per la dichiarazione di indennità (certificazione) da Paratubercolosi delle aziende.

Si ringraziano i colleghi delle ASL lombarde e i tecnici SATA delle APA per la preziosa e fattiva collaborazione.

## **Bibliografia**

- Arrigoni N., Belletti G.L., Cammi G., Taddei R., Pravettoni D., Belloli A., Tamba M. (2004): Diagnosi di paratubercolosi: valutazione di un test ELISA del commercio su siero e latte di animali infetti in forma subclinica. VI Congresso Nazionale S.I.Di.L.V., Abano Terme (PD), 10-12 novembre 2004, 167-168.
- Arrigoni N., Alborali L., Bertoletti I., Boldini M., Fabbi M., Invernizzi A, Losini I., Luini M., Monaci C., Rosignoli C., Sacchi C., Tamba M., Belletti G.L. (2006): Indagine sulla prevalenza della paratubercolosi negli allevamenti bovini da latte della Lombardia. Atti S.I.B., XXXVIII, in corso di stampa.
- INTERNATIONAL DAIRY FEDERATION (IDF)(2001): Monography of the International Dairy Federation Task Force on *Mycobacterium paratuberculosis*. Bulletin of the International Dairy Federation, n.362/2001, Brussels.
- Lillini E., Bitonti G., Gamberale F., De Grossi L., Cersini A. (2005): A survey on the prevalence of bovine paratuberculosis in roman province. Proc. 8th International Colloquium on Paratuberculosis, Copenhagen, 14-18 august 2005 (in press).
- Robbi C., Rossi I., Nardelli S., Rossi E., Toson M., Marangon S., Vicenzi G., Vicenzoni G. (2002): Prevalenza della paratubercolosi (Johnes Disease) nella popolazione di bovine da latte della regione Veneto. Atti S.I.B., XXXIV, 283-288.
- Van Maanen C., Van Schaik G., Van der Meulen A., Waal M., Franken P. (2005): Validation of the Pourquier ELISA to detect antibodies against *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* in individual milk samples and bulk milk samples of Dutch dairy cows and herds. Proc. 8° International Colloquium on Paratuberculosis, Copenhagen, 14-18 agosto 2005 (in corso di stampa).