

Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia-Romagna
*Centro di Referenza Nazionale per la Paratubercolosi - Sezione di Piacenza
**Sezione di Mantova

***Centro Emiliano-Romagnolo Epidemiologia Veterinaria - Sezione di Bologna

****Reparto Produzioni Zootecniche e Sorveglianza epidemiologica degli allevamenti - Brescia

INDAGINE SULLA CONTAMINAZIONE DEL LATTE DI MASSA DA MYCOBACTERIUM AVIUM SUBSP. PARATUBERCULOSIS

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.(*), **Bolzoni G.(****)**, **Cammi G.(*)**, **Losini I.(*)**, **Nigrelli A.(**)**, **Taddei R.(*)**,
Tamba M.(**)**, **Varisco G.(****)**, **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 del latte di massa.

Dei 183 campioni analizzati, mediante coltura e PCR nested, 20 (11%) sono risultati contaminati da *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. Nell'analisi dei fattori di rischio per la contaminazione del latte di aziende infette sono stati presi in considerazione sia la diffusione dell'infezione in allevamento che le misure rivolte a limitare la contaminazione fecale del latte.

SUMMARY

Survey on bulk milk contamination by Mycobacterim avium subsp. paratuberculosis

52 dairy herds, in which paratuberculosis was diagnosed by serological ELISA test (Institut Pourquier) on individual samples, were submitted to repeated bulk milk sampling. On 183 samples tested by culture and nested-PCR, 20 (11%) resulted positive for *Mycobacterium avium* subs. *paratuberculosis*. In the analysis of risk factors for milk contamination, both the paratuberculosis herd prevalence and the hygienic measures taken to control the fecal contamination were taken into consideration.

Introduzione

Mycobacterium avium subsp. *paratuberculosis* (Map) è considerato uno dei possibili agenti infettivi associati al Morbo di Crohn dell'uomo.

Scopo del presente lavoro è valutare, in allevamenti bovini infetti da Paratubercolosi, il rischio di contaminazione del latte di massa da parte di Map.

Materiali e metodi

52 allevamenti di bovine da latte, con stato di infezione paratubercolare accertato mediante esame sierologico individuale ELISA (Institut Pourquier), di cui 21 a bassa sieroprevalenza (<5%), 27 a media sieroprevalenza (5-15%) e 4 ad alta sieroprevalenza (>15%), sono stati sottoposti a prelievo ripetuto del latte di massa.

Ogni allevamento è stato sottoposto ad una media di 3,5 prelievi, a distanza di almeno 30 giorni l'uno dall'altro, allo scopo di campionare tutte le vacche in lattazione. In totale sono stati prelevati 183 campioni di latte di massa.

L'esame colturale sul latte è stato eseguito secondo le metodiche suggerite da Dundee e Coll. (2001).

L'esame PCR è stato eseguito, previa estrazione con separazione magnetica (kit Adiapure, AdiaGene), mediante metodica nested, messa a punto presso il nostro laboratorio.

E' stata redatta una scheda anamnestica, allo scopo di valutare i fattori di rischio per la contaminazione del latte di massa da parte di Map.

Risultati

Su 183 campioni prelevati, 176 sono stati analizzati, mentre 7 non sono stati esaminati perchè coagulati.

	Coltura +	Coltura -	Coltura inquinata	Totale PCR
PCR +	1 (0,6%)	10 (5,7%)	8 (4,5%)	19 (10,8%)
PCR -	1 (0,6%)	135 (76,7%)	21 (11,9%)	157 (89,2%)
Totale coltura	2 (1,1%)	145 (82,4%)	29 (16,5%)	176 (100%)

Tabella 1: risultati delle analisi sui campioni esaminati

I campioni positivi sono risultati complessivamente 20, di cui 1 positivo sia alla coltura che alla PCR.

I 20 campioni positivi erano così distribuiti:

- 3 campioni su 68 (4,4%), provenienti da aziende a bassa sieroprevalenza (<5%);
- 10 campioni su 93 (10,8%), provenienti da aziende a media sieroprevalenza (5-15%);
- 7 campioni su 15 (46,7%), provenienti da aziende ad alta sieroprevalenza (>15%).

Considerando le aziende, in totale hanno fatto registrare almeno un campione positivo 11 aziende su 52 controllate (21,2%), così distribuite:

- 3 aziende su 21 (14,3%) a bassa sieroprevalenza (<5%);
- 5 aziende su 27 (18,6%) a media sieroprevalenza (5-15%);
- 3 aziende su 4 (75,0%) ad alta sieroprevalenza (>15%).

Entrambe le aziende con isolamento di Map in coltura sono risultate positive almeno una volta in PCR.

Delle 11 aziende infette produttrici di latte contaminato, sono risultate positive:

- 6 aziende, su un solo campione;
- 4 aziende, su più di un campione, ma non su tutti;
- 1 azienda, su tutti i campioni.

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.

Incidenza di casi clinici

Nel 42,1% del campione di aziende infette produttrici di latte non contaminato e nel 72,7% di quelle produttrici di latte contaminato è presente sintomatologia clinica riferibile a Paratubercolosi. Inoltre, mentre la malattia ha un'incidenza annua generalmente bassa nei primi (inferiore al 2% nel 97,4% di casi), nelle aziende produttrici di latte contaminato l'incidenza è >2% nel 54,6%.

Tutte le aziende che hanno incidenza di casi clinici superiore al 5%, come pure quelle in cui si registrano casi clinici in animali di età inferiore a 3 anni, sono risultate produttrici di latte contaminato.

Stato della lettiera

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

Nell'87% delle aziende infette produttrici di latte non contaminato le mammelle delle vacche sono risultate pulite o lievemente sporche, mentre il 13% presentava mammelle moderatamente sporche,

ma in nessun caso molto sporche. Nelle aziende produttrici di latte contaminato la percentuale delle aziende con mammelle sporche (da moderatamente a molto) sale al 36%.

Tipo di mungitura

La mungitura alla posta, poiché viene effettuata nell'ambiente dove gli animali vivono, è considerata generalmente un fattore di rischio per la contaminazione fecale del latte. Dall'indagine effettuata risulta che il 18% delle aziende infette adotta questo tipo di mungitura. Nonostante questo, nessuna azienda produttrice di latte contaminato rientra in questa categoria. Al contrario risulta che tutte le aziende produttrici di latte contaminato sono dotate di sala di mungitura, il 54% a pettine, che dovrebbe fornire le maggiori garanzie nel prevenire la contaminazione fecale.

Igiene dell'impianto di mungitura e frigorifero

Nel 91% delle aziende produttrici di latte contaminato la carica batterica è <50.000 cfu/ml e nel 100% è <100.000 cfu/ml. Pertanto il valore di carica batterica non può essere considerato un fattore indicativo di contaminazione del latte da parte di Map, come era d'altra parte presumibile, dato che la carica batterica del latte è influenzata in gran parte dalla pulizia delle attrezzature di raccolta e conservazione del latte, nonché dalla sua pronta e corretta refrigerazione e solo in minima parte risente dell'igiene di mungitura e della pulizia delle mammelle, più direttamente correlate alla contaminazione fecale del latte.

Igiene della mungitura

Nelle aziende produttrici di latte contaminato, a fronte di un 27,3% di aziende in cui la pulizia della mammella non viene eseguita correttamente, vi è un 72,7% di aziende che esegue una pulizia adeguata, di cui 45,5% in maniera ottimale (fazzolettino con disinfettante seguito da asciugatura con carta a perdere), facendo rilevare un livello igienico addirittura superiore alle aziende produttrici di latte non contaminato.

Filtrazione del latte

Più del 90% delle aziende esegue la filtrazione del latte e cambia almeno giornalmente i filtri, sia nell'ambito delle aziende produttrici di latte contaminato che in quelle produttrici di latte non contaminato.

Discussione e conclusione

L'esame colturale del latte di massa, nonostante i dati promettenti di sensibilità in condizioni sperimentali, ha dimostrato notevoli problemi, legati in particolare alle frequenti contaminazioni da parte di microrganismi ambientali, in particolare da *Mycobacterium porcinum*, inibenti la crescita di Map, che hanno dato luogo a false negatività e di conseguenza ad una limitata sensibilità del metodo diagnostico (Taddei e Coll. 2005). E' probabile che le difficoltà legate all'organizzazione complessa del campionamento, alla conservazione prolungata del campione in condizioni non ottimali e quindi al suo trasporto in più fasi al laboratorio, abbiano influenzato negativamente la qualità del campione e quindi la qualità del risultato.

Se applicata al latte di massa, la PCR appare, oltre che più rapida e decisamente più sensibile rispetto al test colturale, essere in grado di evidenziare con maggiore probabilità, almeno nelle condizioni critiche in cui si è operato, la contaminazione del latte da parte di Map (PCR 10,8% vs. coltura 1,1%) nei campioni provenienti da aziende sicuramente infette.

Complessivamente all'esame colturale e/o alla PCR sono risultati positivi il 21,2% (limiti fiduciali 95%: 11,1% - 34,7%) degli allevamenti infetti.

L'eliminazione di Map con il latte appare correlata con la sieroprevalenza intraaziendale: i campioni prelevati da aziende ad elevata sieroprevalenza risultano positivi con probabilità elevata (46,7%), mentre quelli prelevati da aziende a media e bassa prevalenza risultano positivi in percentuali significativamente inferiori, rispettivamente del 10,7% e del 4,4%. E' da notare come il campionamento ripetuto aumenti sensibilmente la percentuale di positività.

La contaminazione del latte di massa può avvenire sia per contaminazione endogena, a seguito di diffusione linfoematogena, ma anche esogena, per contaminazione fecale della cute della

mammella, in particolare in allevamenti ad alta prevalenza di infezione e con scadenti condizioni igienico-sanitarie (Arrigoni e coll. 2004).

Dai dati anamnestici raccolti, la probabilità di contaminazione del latte appare direttamente correlata sia alla diffusione dell'infezione nell'allevamento (alta incidenza di casi clinici e loro comparsa in animali giovani) che allo stato igienico delle mammelle. Al contrario 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.

E' opportuno pertanto che, per ridurre il rischio di contaminazione del latte da parte di Map, ci si rivolga da una parte ad individuare ed eliminare le bovine infette ed in particolare quelle che eliminano grosse quantità di Map con le feci e dall'altra all'applicazione di misure di ordine igienico sanitario e manageriale volte a ridurre la contaminazione fecale della mammella in allevamento. L'applicazione di indicatori di contaminazione fecale del latte, come la ricerca dei coliformi, potrebbe essere utile nel fornire informazioni rapide sul livello di rischio da contaminazione di Map in aziende infette, unitamente al livello di prevalenza aziendale.

E' necessario, come raccomandato anche da varie Autorità Sanitarie Europee, iniziare a prendere provvedimenti al fine di ridurre la prevalenza aziendale, al fine di limitare il rischio di contaminazione della catena alimentare e quindi il rischio di esposizione dell'uomo.

Il problema appare particolarmente urgente per gli allevamenti che vendono latte crudo; è necessario prevedere nell'autocontrollo di tali aziende, a fianco delle garanzie sanitarie per altri patogeni, dei parametri sanitari che garantiscano un controllo del rischio di contaminazione del latte da parte di Map.

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

Bibliografia

- Arrigoni N., Cesena C., Belletti G.L., Pravettoni D., Belloli A. (2004): Presenza di *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* nel latte di bovine con infezione subclinica: dati preliminari per l'analisi del rischio. Atti Soc. It. Buiatria XXXVI, 143-148.
- Dundee L., Grant I.R., Ball H.J., Rowe M.T. (2001): Comparative evaluation of four decontamination protocols for isolation of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* from milk. Lett. Appl. Microbiol. 33: 173-177.
- Taddei R., Barbieri I., Pacciarini M.L., Losini I., Cammi G., Belletti G.L., Arrigoni N. (2005): An IS900 like sequence in *M.porcinum* strains isolated from bovine bulk milk: implications for diagnosis. Proc. 8° International Colloquium on Paratuberculosis, Copenhagen, 14-18 agosto 2005 (in corso di stampa).