

TITOLO

“Piano di monitoraggio sulla prevalenza della paratubercolosi nella popolazione bufalina della Regione Campania. Valutazione dell’applicabilità del Piano Nazionale alla specie”

Responsabile del Progetto: dott.ssa Esterina De Carlo, Dirigente Veterinario Responsabile del Centro di Referenza Nazionale sull’igiene e le tecnologie dell’allevamento e delle produzioni bufaline (CReNBuF)(IZSME).

Collaborazioni: dott.ssa Norma Arrigoni, Responsabile del Centro di Referenza Nazionale per la Paratubercolosi (IZSLER).

AREA DI INQUADRAMENTO:

Sanità Animale

DURATA:

24 mesi.

MOTIVAZIONI:

La paratubercolosi (malattia di Johne) è una malattia infettiva dei ruminanti domestici e selvatici globalmente diffusa, causata da *Mycobacterium avium* subsp. *Paratuberculosis* (MAP). Sebbene la comunità scientifica non abbia ancora raggiunto un giudizio definitivo sul potenziale ruolo zoonosico di MAP, l’interesse nei confronti di questa malattia come fattore scatenante di varie patologie dell’uomo (Malattia di Crohn, Diabete tipo 1, Sclerosi multipla, Tiroidite di Hashimoto) è in aumento. Il latte rappresenta la principale, anche se non l’unica, fonte di esposizione per l’uomo, in particolare per le fasce deboli della popolazione. La filiera lattierocasearia relativa a tutte le specie ruminanti, bovina, ovicaprina e bufalina è quindi molto coinvolta ed interessata da questa problematica, in particolare dopo la richiesta di garanzie sanitarie da parte di alcuni paesi terzi (Cina, Russia ed India) nei confronti della paratubercolosi. Relativamente alla specie bufalina, è da segnalare la crescente richiesta a scopo di esportazione di prodotti lattierocaseari derivati dal latte di questa specie, *in primis* la “Mozzarella di Bufala Campana” (DOP).

La paratubercolosi è in grado di colpire tutte le specie di ruminanti, incluso il bufalo (*Bubalus bubalis*), nonché altri animali selvatici, quali ad es. i lagomorfi. La malattia è caratterizzata nella specie bovina da grave enterite cronica, diarrea, calo ponderale, riduzione della produzione di latte e conseguente riforma anticipata (Motiwala *et al.* 2006), con conseguenti danni economici rilevanti. Minori informazioni sono disponibili a proposito della forma clinica nel bufalo, nel quale sembra essere più rara, ma con caratteristiche simili a quelle del bovino (Dalto *et al.*, 2012).

A seguito delle richieste di garanzie sanitarie nei confronti della paratubercolosi da parte di alcuni Paesi extra UE (Cina, India, Russia), su richiesta del Ministero della Salute, il Centro di Referenza Nazionale per la paratubercolosi ha elaborato le “Linee Guida per l’adozione di piani di controllo e per l’assegnazione della qualifica sanitaria degli allevamenti nei confronti della paratubercolosi bovina”, approvate in Conferenza Stato Regioni (GU. 271 del 19/11/2013, S.O. 79).

Gli obiettivi delle linee guida sono:

- creare un sistema di notifica obbligatoria dei casi clinici;
- stimolare i proprietari di allevamenti infetti ad attuare programmi di controllo per ridurre la prevalenza della malattia attraverso l’applicazione di test diagnostici e piani di biosicurezza;
- certificare la probabilità di indennità degli allevamenti attraverso un sistema a più livelli, allo scopo di garantire la compravendita di prodotti (latte, animali da rimonta, sperma).

Al momento, le Linee Guida sono riferite specificatamente alla specie bovina, a cui la specie bufalina è stata assimilata in deroga, in particolare per la segnalazione dei casi clinici con relativa

conferma in PCR dalle feci. Questo aspetto è di particolare importanza per la certificazione delle produzioni, data la richiesta crescente del prodotto tipico DOP “Mozzarella di Bufala Campana”, in particolare verso Paesi esteri. Il test ELISA è al momento il più utilizzato per il controllo della paratubercolosi ed è il test previsto dalle Linee Guida Nazionali per l’attribuzione delle qualifiche sanitarie agli allevamenti bovini e bufalini. I kit ELISA attualmente disponibili per la diagnosi di paratubercolosi non sono però adeguatamente supportati da dati robusti di validazione relativi alle performances dei test nella specie bufalina. Al momento, il gold-standard raccomandato dal Manuale Terrestre OIE (capitolo 2.1.11) per la diagnosi di paratubercolosi è l’esame colturale, da eseguire sulle feci per la diagnosi intra-vitam o sui tessuti per la diagnosi post-mortem. Tuttavia la sensibilità di tali test è bassa, non adeguata per l’utilizzo come gold-standard nella validazione di test indiretti. Sulla base di queste criticità, alcuni ricercatori hanno proposto come gold-standard il test PCR, che ha dimostrato maggiore sensibilità (Sivakumar et al.,2005), tempi di risposta più rapidi e costi più ridotti rispetto alla coltura; tuttavia, un consenso generale da parte della comunità scientifica internazionale su questo aspetto non è ancora stato raggiunto.

Relativamente all’assegnazione delle qualifiche sanitarie, basate su indagini sierologiche mediante test ELISA, mancano però dati precisi in bibliografia sulle relative performances dei test diagnostici, anche se il Centro di Referenza ha eseguito una preliminare prova di validazione di tali test in parallelo al test PCR da feci. Tutti i dati pubblicati sono relativi alle performances del test ELISA nella specie bovina, dati non direttamente applicabili sulla specie bufalina. Questa realtà zootecnica e di filiera è infatti tipicamente italiana e di pochi altri Paesi extra-europei, soprattutto asiatici e sudamericani. Per questo motivo, le aziende produttrici di kit diagnostici non dispongono di dati accurati e non forniscono report di validazione sul bufalo.

Le prime segnalazioni di paratubercolosi nel bufalo risalgono al 1999 (Lillini *et al.*, 1999).

Nonostante ciò, non sono disponibili dati nazionali di prevalenza sierologica di paratubercolosi negli allevamenti bufalini, ad eccezione di aree ristrette del sud Italia (Pesce *et al.* 2014), dove la prevalenza di allevamenti infetti risulta circa il 28%.

In altri paesi, quali l’India, l’indagine sierologica è spesso eseguita tramite kit ELISA *home-made*, allestiti a partire da ceppi di MAP isolati in loco (Singh *et al.* 2007). Da tali studi emerge che, ove la malattia è presente, tende ad avere una sieroprevalenza intra-aziendale sovrapponibile a quella del bovino. Ciò non è sempre stato riscontrato in Italia, dove sono comunemente utilizzati kit ELISA commerciali. Una robusta validazione per i kit ELISA commerciali si rende quindi necessaria, per estendere in maniera adeguata l’applicazione delle Linee Guida anche al comparto bufalino, oltre ad una precisa indagine epidemiologica, con cui stabilire la reale prevalenza della malattia nelle zone ad alta densità zootecnica, come appunto la regione Campania, per apportare le opportune modifiche applicative alle Linee Guida nazionali.

Relativamente alla diagnosi diretta, secondo la maggior parte degli studi, il test diagnostico diretto più sensibile per la diagnosi di paratubercolosi nel bufalo è il test IS900-PCR (Sivakumar et al. 2005; Lillini *et al.* 2002), essendo l’isolamento di alcuni ceppi di origine bufalina spesso difficoltoso. Per questo motivo, all’interno delle prove di validazione verrà utilizzato il test PCR come gold standard. La coltura fecale verrà invece eseguita unicamente dai campioni positivi al test PCR, con l’intento di isolare i ceppi di MAP di origine bufalina per sottoporli a sub-tipizzazione molecolare per scopi epidemiologici.

Bibliografia:

1. Lillini E, Gamberale F, Di Guardo G. Mycobacterium paratuberculosis infection in a water buffalo (*Bubalus bubalis*) from central Italy. In: Manning EJB, Collins MT, editors. *Proceedings of the sixth ICP*, Melbourne, Australia; 1999. p. 19.
2. Lillini E, Gamberale F, De Grossi L, Cersini A, Scherm B, Fagiolo A. Comparative study in detection of Mycobacterium avium subsp paratuberculosis by PCR diagnosis and conventional culture on faeces of water-buffalo herds in Latium region (Italy). In: Juste RA, Geijo MV, Garrido JM, editors *Proceedings of the seventh ICP*. Bilbao, Spain, 2002. p. 283–6.

3. Sivakumar P, Tripath BN, Singh N. Detection of Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis in intestinal and lymph node tissues of water buffaloes (*Bubalus bubalis*) by PCR and bacterial culture. *Veterinary Microbiology* 108 (2005) 263–270.
4. Sivakumar P, Tripathi BN, Singh N, and Sharma AK. Pathology of Naturally Occurring Paratuberculosis in Water Buffaloes (*Bubalus bubalis*). *Vet Pathol* 43 (2006) 455–462.
5. Dalto AC, Bandarra PM, Pavarini SP, Boabaid FM, de Bitencourt AP, Gomes MP, Chies J, Driemeier D, da Cruz CE. Clinical and pathological insights into Johne's disease in buffaloes. *Trop Anim Health Prod.* 44 (2012) 1899-1904.
6. Singh SV, Singh AV, Singh R, Sharma S, Shukla N, Misra S, Singh PK, Sohal JS, Kumar H, Patil PK, Misra P, Sandhu KS. Sero-prevalence of bovine Johne's disease in buffaloes and cattle population of North India using indigenous ELISA kit based on native Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis 'Bison type' genotype of goat origin. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* 31 (2008) 419-433
7. Pesce A., Coppa P., Salzano C., Garofalo F., Mosca E., Martucciello A., Guarino A. Preliminary results: seroprevalence of paratuberculosis in dairy herds reared in Caserta, southern Italy area. *Proceedings of the 12th ICP*. Parma, Italy, 2014. p. 193.

OBIETTIVI:

1. Formazione dei Medici Veterinari all'individuazione di soggetti affetti dalla malattia nei diversi stadi clinici e all'individuazione di lesioni sospette durante l'esame anatomopatologico, nonché al prelievo degli organi o di altro materiale idoneo alla diagnosi, da inviare al laboratorio
2. Armonizzazione e standardizzazione dell'esecuzione di indagine epidemiologica e rilevamenti di biosicurezza con schede dedicate, in caso di individuazione di allevamenti con patologia in atto, o con prevalenza sierologica rilevante
3. Definizione della prevalenza della malattia sul territorio regionale campano
4. Valutazione delle performances di sensibilità e specificità dei Kit ELISA disponibili in commercio
5. Definizione del ruolo epidemiologico del bufalo nei confronti degli altri ruminanti
6. Valutazione dell'applicabilità delle "Linee Guida per l'adozione di piani di controllo e per l'assegnazione della qualifica sanitaria degli allevamenti nei confronti della paratubercolosi bovina", approvate in Conferenza Stato Regioni (GU. 271 del 19/11/2013, S.O. 79) con gli obiettivi di :
 - creare un sistema di notifica obbligatoria dei casi clinici;
 - stimolare i proprietari di allevamenti infetti ad attuare programmi di controllo per ridurre la prevalenza della malattia attraverso l'applicazione di test diagnostici e piani di biosicurezza;
 - certificare la probabilità di indennità degli allevamenti attraverso un sistema a più livelli, allo scopo di garantire la compravendita di prodotti (latte, animali da rimonta, sperma).
7. Sensibilizzazione degli allevatori, attraverso formazione specifica, all'adesione ad un Piano volontario di eradicazione, per il raggiungimento della qualifica di allevamento U.I.

RISULTATI ATTESI:

- 1) La raccolta di dati di validazione robusti per l'utilizzo di test ELISA nella specie bufalina permetterà di elaborare dati di sensibilità e specificità, individuando valori di cut-off ottimali per la specie bufalina, massimizzando la predittività diagnostica nei confronti della paratubercolosi.
- 2) I dati di performances diagnostica nei confronti di questa malattia nella specie bufalina sono necessari per un'adeguata applicazione delle Linee Guida per l'adozione di piani di controllo e per l'assegnazione della qualifica sanitaria nei confronti della paratubercolosi in allevamenti bufalini.
- 3) Dalla formazione degli operatori sanitari ci si aspetta maggiore sensibilità nell'individuazione e segnalazione di eventuali capi affetti dalla malattia.
- 4) La formazione dei veterinari aziendali consentirà di applicare idonee misure di biosicurezza negli allevamenti che intendano aderire al piano volontario di eradicazione
- 5) Maggiore coscienza dei rischi, da parte degli allevatori, correlati alla presenza della malattia nell'allevamento
- 6) Sensibilità maggiore all'adesione al Piano

METODO E MATERIALI:

Monitoraggio su situazione epidemiologica regionale:

Il test sierologico ELISA, che mette in evidenza gli anticorpi a seguito di infezione da MAP, è quello consigliato per economicità e rapidità di esecuzione. A causa della particolarità dell'agente patogeno oggetto di indagine, rileva nelle fasi iniziali dell'infezione una sensibilità non eccellente, che però arriva sino all'90% in caso di soggetti infetti da molto tempo e con forma clinica.

Per stimare correttamente la prevalenza di infezione è necessario effettuare il test sierologico su tutti i capi di età superiore ai 24 mesi. Questo sistema consentirebbe di definire la prevalenza di infezione sia a livello di allevamento che di animali nella popolazione bufalina della Regione Campania. Inoltre, praticando l'indagine sul totale degli allevamenti bufalini, già sarà noto, per ogni allevamento, il livello di infezione di partenza, in caso di adozione volontaria di un Piano.

A tal fine possono essere utilizzati i sieri conferiti per la Profilassi di Stato, dividendo l'indagine regionale in due anni. La popolazione bufalina regionale con età superiore ai 24 mesi corrisponde a 227.086 capi, così divisi: 8970 maschi, 44472 femmine tra 18 e 36 mesi, 37858 femmine tra 36 e 51 mesi (primipare), 60493 femmine tra 51 e 81 mesi (pluripare), 75293 femmine con più di 81 mesi (pluripare oltre i 3 parti). Il Piano di monitoraggio potrebbe pertanto prevedere orientativamente 115.000 analisi sierologiche annuali, escludendo dal secondo anno le aziende già testate nell'anno precedente. Ovviamente le risultanze sierologiche saranno alla fine del progetto riviste, dopo accurata validazione dei metodi in uso.

Validazione test sulla specie bufalina

Al fine di validare il test sierologico, individuati almeno 10 allevamenti tra quelli con sieroprevalenza più elevata, verranno campionate dapprima le feci dei capi positivi al test ELISA, al fine di confermare la presenza di infezione; se confermata almeno da una PCR positiva, verranno campionate le feci di tutti i capi sottoposti ad indagine sierologica nell'allevamento. . Questo perchè sarà necessario avere un pannel di sieri provenienti da animali certamente escretori, seppur asintomatici, da considerare gold standard. Infatti, in accordo con i compiti istituzionali del Centro di Referenza Nazionale per la Paratubercolosi, che prevedono la standardizzazione delle metodiche

diagnostiche, saranno valutate le performances, in termini di accuratezza (sensibilità e specificità diagnostica), dei kit ELISA disponibili in commercio su un panel di sieri provenienti da animali infetti (positivi al test PCR IS900 da feci) e da animali negativi (negativi al test PCR IS900 da feci), provenienti da allevamenti bufalini con anamnesi negativa alla paratubercolosi, secondo quanto prescritto dal capitolo 1.1.5 e dalle linee guida 3.6.1, 3.6.5 e 3.6.6 del Manuale OIE.

Inoltre, visti i pochi dati disponibili sulle caratteristiche genomiche dei ceppi di origine bufalina e sul possibile ruolo epidemiologico del bufalo nei confronti del bovino e di altri ruminanti, saranno isolati e sub-tipizzati ceppi di campo di MAP. L'ipotesi di lavoro prevede la raccolta di un'adeguata quantità di dati utilizzabili per la validazione di kit ELISA attualmente disponibili, per la diagnosi di paratubercolosi nel bufalo.

Quindi, per la valutazione delle performances dei test ELISA su siero (sensibilità diagnostica, specificità diagnostica e cut-off) saranno utilizzati:

- sieri di animali positivi (esito positivo al test IS900 PCR su feci);
- sieri di animali negativi (esito negativo di uno o più test IS900 su feci), provenienti da allevamenti con anamnesi negativa per paratubercolosi (esito negativo a test sierologici e/o diretti su tutti i capi adulti presenti in allevamento, assenza casi clinici).

Sui campioni di feci positive al test PCR verrà eseguito l'esame colturale, con lo scopo di isolare ceppi di campo provenienti dalla specie bufalina. I ceppi isolati saranno sub-tipizzati mediante sequenze Mini-Micro-satellite. Inoltre, alcuni ceppi selezionati saranno processati mediante sequenziamento dell'intero genoma, per analisi filogenetiche.

I test utilizzati saranno:

- PCR su feci: mediante metodica IS900-qPCR, validata dal Centro di Referenza Nazionale
- per la paratubercolosi.
- Coltura fecale: mediante metodo normato OIE (capitolo 2.2.11 del Manuale OIE), per
- centrifugazione e doppia incubazione, validato dal CdRN per la paratubercolosi.
- Sub-tipizzazione MAP: mediante analisi di dieci loci mini- e tre loci micro-satellite. Il
- metodo è attualmente utilizzato presso il CdRN per la paratubercolosi.
- Sequenziamento genomico di MAP: il servizio di sequenziamento del genoma è già presente presso IZSLER, ed utilizza il sistema ILLUMINA MySeq.

Attività di formazione

Si prevedono due incontri formativi, effettuati con il supporto del Centro di Referenza Nazionale sulla Paratubercolosi, da erogare ai Medici Veterinari ASL sia di area A che di Area B, nonché ai liberi professionisti, al fine di preparare i professionisti all'eventuale applicazione di un Piano anche alla specie bufalina.

Pertanto nello svolgimento dello studio il CRENBuF svolgerà le seguenti attività:

- Supporto alla Regione Campania nel coordinamento delle attività e organizzazione di incontri periodici (almeno uno all'anno) con il personale coinvolto, la Regione e il CdRN-paratubercolosi
- Coordinamento delle attività di prelievo di feci negli allevamenti in cui risultano capi positivi

- Prelievi di feci negli allevamenti bufalini insistenti nella provincia di Salerno, Avellino e Benevento
- Esecuzione del test ELISA screening per paraTBC
- Invio alla sede centrale e al CdRN dei campioni di feci raccolti
- Stesura della relazione finale sui risultati ottenuti
- Attività di divulgazione dei dati ottenuti unitamente alle altre unità operative

La sede provinciale di Caserta svolgerà le seguenti attività:

- Prelievi di feci negli allevamenti bufalini insistenti nella provincia di Caserta
- Esecuzione del test ELISA screening per paraTBC
- Collaborazione alla stesura della relazione finale sui risultati ottenuti
- Collaborazione alle attività di divulgazione dei dati ottenuti unitamente alle altre unità operative
- Invio alla sede centrale e al CdRN dei campioni di feci

La sede di Portici svolgerà le seguenti attività:

- Esecuzione dell'esame PCR per M. paratuberculosis

Il CdRN per la Paratuberculosis dell'IZSLER svolgerà le seguenti attività:

- Partecipazione ad eventi di formazione dedicati agli operatori del territorio
- Esame microbiologico per la ricerca diretta di MAP dai campioni fecali
- Genotipizzazione dei ceppi isolati
- Analisi statistica dei risultati ottenuti
- Adeguamento delle “Linee Guida per l'adozione di piani di controllo e per l'assegnazione della qualifica sanitaria degli allevamenti nei confronti della paratuberculosis bovina”, approvate in Conferenza Stato Regioni (GU. 271 del 19/11/2013, S.O. 79), per l'applicazione nella specie bufalina.

Il CREMOPAR, per l'Area di “Formazione, informazione e ricerca applicata” svolgerà le seguenti attività:

- Organizzazione della formazione degli allevatori
 - Organizzazione della formazione del personale sanitario
- Per entrambe le attività si avvarrà della collaborazione dei due IIZZSS coinvolti nel progetto

Si chiederebbe il supporto Regionale al fine di contribuire nelle seguenti attività:

- Supporto delle attività sul territorio per l'esecuzione dei prelievi previsti dal progetto ad opera di Medici Veterinari dell'IZS del Mezzogiorno, attraverso la gestione dei flussi informativi tra territorio e IZSM
- Coordinamento delle attività formative
- Attività di divulgazione dei dati ottenuti

Le attività descritte prevedono per lo svolgimento, per le UU.OO, quanto riportato in tabella:

VOCI DI SPESA	UNITA' 1 IZSME		UNITA' 2 IZSLER		UNITA' 3 UNINA (FORMAZIONE, INFORMAZIONE, RICERCA)		TOTALE
	2017	2018	2017	2018	2017	2018	
- attrezzature	20.000						20.000
- materiale di consumo	95.250	95.250	4.200	1.800			196.500
- missioni	2.500	2.500	2.800	1.200			9.000
-n.2 Borse di studio per Medico Veterinario (comprehensive di spese di missione)					45.000	45.000	90.000
- spese generali (max. 10%)	500	500	500				1.500
(1) TOTALE	118.250	98.250	7.500	3.000	45.000	45.000	317.000