



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI MILANO
FACOLTÀ DI MEDICINA VETERINARIA

SCUOLA DI DOTTORATO
SANITA' E PRODUZIONI ANIMALI: SCIENZA, TECNOLOGIA E BIOTECNOLOGIE

DIPARTIMENTO DI PATOLOGIA ANIMALE, IGIENE
E SANITA' PUBBLICA VETERINARIA
Sezione di Malattie Infettive

DOTTORATO DI RICERCA IN IGIENE VETERINARIA
E PATOLOGIA ANIMALE – XXIII CICLO

**INDAGINE SULLA PRESENZA DI PATOGENI ZONOSICI IN
ALLEVAMENTI DI BOVINE DA LATTE DEL COMPENSORIO
LOMBARDO**

VET 05

Docente guida: Dr.ssa Renata Piccinini

Coordinatore del Dottorato: Prof. Claudio Genchi

Tesi di Dottorato di:

Beatrice Bignami

Anno Accademico 2009-2010

INDICE

<u>1. INTRODUZIONE.....</u>	<u>3</u>
<u>2. AGENTI PATOGENI.....</u>	<u>7</u>
2.1 Escherichia coli.....	8
2.2 Salmonella spp.	11
2.3 Staphilococcus aureus.....	13
2.4 Listeria monocytogenes.....	17
2.5 Campylobacter spp.....	20
2.6 Yersinia enterocolitica.....	23
2.7 Prototheca spp.....	25
2.8 Mycobacterium avium subsp.paratuberculosis.....	27
<u>3. MORBO DI CROHN.....</u>	<u>32</u>
<u>4. LEGISLAZIONE.....</u>	<u>40</u>
<u>5. SCOPO DEL PROGETTO.....</u>	<u>44</u>
<u>6. APPROCCIO METODOLOGICO.....</u>	<u>46</u>
<u>7. MATERIALI E METODI.....</u>	<u>49</u>
<u>8. RISULTATI.....</u>	<u>56</u>
<u>9. DISCUSSIONE.....</u>	<u>67</u>
<u>10. CONCLUSIONI.....</u>	<u>73</u>
<u>BIBLIOGRAFIA.....</u>	<u>75</u>

1. INTRODUZIONE

La crescente attenzione e consapevolezza dei consumatori nei confronti della sicurezza alimentare, ha recentemente chiesto ai produttori di derrate alimentari un incremento dei livelli di controllo di tutte le fasi della filiera produttiva.

In Lombardia uno dei comparti produttivi più importanti è rappresentato dalla zootecnia bovina del latte, che da sola rappresenta il 24% della PVL agricola regionale (Istat, 2006), riassumendo in sé sia la filiera relativa al latte in quanto tale, che quella inerente le produzioni lattiero casearie.

Annualmente infatti, vengono prodotte circa quattro milioni di tonnellate di latte, pari al 37% della produzione nazionale. Di queste il 20% è destinato alla vendita di tipo alimentare, mentre l'80% alla trasformazione (Regione Lombardia, 2007), orientata principalmente alla produzione di formaggi DOP.

Di elevata entità sono anche i livelli produttivi degli allevamenti lombardi, con una media di 9000 litri annui di latte per bovina, negli allevamenti sottoposti a controllo funzionale (AIA, 2006), che sono caratterizzati per altro da ottimi standard qualitativi.

Recente tendenza del settore lattiero-caseario è quella del consumo di latte crudo, che ha coinvolto anche la Lombardia, come dimostrato dai dati del 2008 dell'ARAL che riportano la presenza sul territorio di circa 200 aziende che effettuano la commercializzazione diretta.

La qualità microbiologica costituisce un requisito di base del latte, sia di quello destinato ad uso alimentare, che di quello avviato alla trasformazione. La carica batterica del latte è soggetta a precisi limiti di legge per la commercializzazione, oltre ad essere uno dei parametri su cui si basa il pagamento differenziato del latte in funzione della qualità. In Europa il limite legale per il contenuto in germi del latte è di 100.000 UFC/mL (REG. CE n. 853/2004), calcolato come media geometrica di almeno quattro campioni eseguiti in due mesi successivi. Più recentemente la Regione Lombardia ha fissato un limite di 25.000 UFC/mL per il latte crudo destinato alla vendita diretta al consumatore (Circolare 19/SAN 07).

L'eccessiva contaminazione batterica costituisce un fattore indesiderato nel caso di latte destinato al consumo per la riduzione della conservabilità, per il possibile sviluppo di sapori sgradevoli e per la necessità di ricorrere a trattamenti termici intensi. La carica batterica del latte può costituire inoltre un segnale indiretto di eventuali contaminazioni da microrganismi patogeni. Nel caso del latte crudo

destinato alla vendita diretta, il grado e il tipo di contaminazione batterica diventano parametri di grandissima importanza. Anche nel processo di caseificazione la contaminazione batterica può costituire un problema sia per la competizione operata nei confronti dei microrganismi filocaseari che per eventuali alterazioni, anche gravi, delle caratteristiche dei prodotti indotte dallo sviluppo di batteri anomali o dalla presenza di loro enzimi.

Dai dati pubblicati sul sito dell'Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia (IZSLER, 2010) emerge che la qualità del latte lombardo, nel corso dell'ultimo trentennio, ha fatto registrare importanti miglioramenti sotto il profilo igienico-sanitario. In particolare l'andamento della carica batterica totale nel latte lombardo ha visto negli ultimi 10 anni un continuo miglioramento, inizialmente più rapido e successivamente più lento; il miglioramento marginale infatti appare sempre più piccolo e difficile da conseguire man mano che i valori medi complessivi si riducono. Parallelamente, sempre nel latte lombardo, si è ridotta in maniera importante negli anni la percentuale di campioni non conformi (cioè con valori di carica superiori al limite legale) sul totale dei campioni di latte analizzati. Sempre dai dati messi a disposizione dall'Istituto Zooprofilattico (IZSLER, 2010) emerge tuttavia che, a fronte di valori medi annuali assolutamente rassicuranti, l'andamento mensile della carica batterica nel corso degli ultimi quattro anni ha continuato a mostrare incrementi sensibili in corrispondenza del periodo caldo. Comunemente inoltre in molti allevamenti si rilevano periodici innalzamenti improvvisi e anormali della carica batterica del latte, le cui cause non sono sempre facilmente individuabili.

La carica batterica del latte dipende in massima parte dalle condizioni igieniche in cui si svolgono i diversi processi che costituiscono la filiera del latte. Per quanto riguarda specificatamente la fase produttiva che si svolge presso la stalla, la contaminazione batterica è influenzata da una molteplicità di fattori tra cui le condizioni igieniche in allevamento, il grado di pulizia degli animali e delle mammelle in particolare, la sanità degli animali, la preparazione della mammella in pre-mungitura, le modalità di mungitura, le modalità di lavaggio dell'impianto di mungitura e le condizioni di conservazione del latte fino al momento del ritiro (Kelly *et al.*, 2009). Inoltre le condizioni ambientali di temperatura e umidità possono influire notevolmente sulla contaminazione batterica del latte sia in termini quantitativi che in termini qualitativi.

Oltre ad una bassa carica batterica, al latte commercializzato si richiede anche un elevato livello sanitario.

Indagini degli ultimi anni, se hanno sottolineato da un lato la scomparsa di brucellosi e tubercolosi, d'altro canto hanno evidenziato l'avvento di nuovi batteri che se presenti nel latte possono rappresentare un rischio per il consumatore (Cliver and Riehman, 2002; Krauss *et al.*, 2003).

Tali batteri sono stati definiti nuovi patogeni emergenti e sebbene nessuno di loro sia stato coinvolto in importanti focolai di malattia nel nostro Paese, numerosi sono gli episodi che li riguardano in altre nazioni.

Pertanto, in base al principio di precauzione europeo, sottovalutare il potenziale pericolo rappresentato dai patogeni emergenti sarebbe miope per le possibili conseguenze negative sia per quanto riguarda la tutela del consumatore, che per quanto concerne il reddito degli allevatori.

I batteri implicati nelle tossinfezioni alimentari, e trasmessi all'uomo mediante il latte sono presenti a livello aziendale (Kapperud, 1991; Lejeune *et al.*, 2004; Devane *et al.*, 2005; Thevenot *et al.*, 2005), e spesso la vacca rappresenta un *carrier* asintomatico di questi agenti zoonosici.

Di particolare rilevanza sono i ceppi verocitotossici di *Escherichia coli*, *Listeria monocitogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella spp.*, *Yersinia enterocolitica* e *Campylobacter spp.* che sebbene presente in misura ridotta rispetto agli allevamenti avicoli, viene comunque rinvenuto in quelli bovini.

Con un ruolo apparentemente più marginale anche *Mycobacterium avium* subsp.*paratuberculosis* e *Prototheca* sono due batteri che potrebbero avere un ruolo nello sviluppo di patologie umane.

Con questi presupposti, si rende necessaria una maggior conoscenza dell'epidemiologia di questi batteri sul nostro territorio.

2. AGENTI PATOGENI

2.1 Escherichia coli

E.coli è un batterio Gram negativo normalmente presente nel tratto gastroenterico degli animali, sin dalle prime ore di vita. Rappresenta un componente della normale flora microbica intestinale e gioca un ruolo cardine nel mantenimento della fisiologia d'organo (Yoon J.W. et al., 2008). Rappresenta infatti il batterio anaerobio facoltativo maggiormente presente nel tratto intestinale, con concentrazioni comprese tra 10^7 e 10^9 microrganismi per grammo di feci. Tale concentrazioni è ridotta nel primo tratto dell'intestino, ma va aumentando progressivamente fino a raggiungere la massima concentrazione nel grosso intestino (Gyles C.L. et al., 2004).

Nel corso dell'evoluzione alcuni ceppi di coli hanno acquisito dei fattori di virulenza, passando così da batteri commensali a batteri patogeni (Yoon J.W. et al., 2008).

Gli *E.coli* sono stati classificati negli anni sulla base di diversi criteri, ma recentemente i ceppi patogeni. Pertanto sulla base delle loro caratteristiche cliniche vengono distinti in: diarrogeni, uropatogeni, e associati a meningiti e sepsi. Quelli che albergano nel tratto intestinale a loro volta sono suddivisi in sei categorie che tengono conto dei fattori di virulenza, dei meccanismi d'azione e delle manifestazioni cliniche (Yoon J.W. et al., 2008).

Esistono pertanto ceppi ETEC (enterotossigeni), EPEC (enteropatogeni), EHEC (enteroemorragici), EAEC (enteroaggriganti), coli EIEC (enteroinvasivi) e coli DAEC (diffusamente aderenti).

La categoria più rilevante ai fini della nostra indagine è quella degli EHEC, in quanto sono anche ceppi produttori di tossine che inibiscono la sintesi proteica all'interno di cellule eucariote, definite verocitotossine (VT) o tossine Shiga-like (STx), per la loro similitudine alle tossine prodotte da *Shigella dysenteriae*. Tali ceppi vengono pertanto riconosciuti sia come produttori di tossine STX (STEC), che di tossine VT (VTEC) (Caprioli et al., 2005).

Gli *E.coli* enteroemorragici (EHEC) costituiscono un sottogruppo del sierotipo STEC, strettamente associato a diarrea emorragica e sindrome uremica emolitica nei paesi industrializzati. Nella maggior parte dei casi la patologia è conseguente ad infezione da ceppi sierotipo O157:H7, tuttavia le infezioni sostenute dai ceppi EHEC appartenenti ad altri sierogruppi, come O26, O111, O103 e O145, stanno aumentando (Caprioli et al., 2005).

STEC/EHEC rappresentano l'unico gruppo di *E.coli* definito patogeno zoonosico e di cui i bovini rappresentano il *reservoir* principale delle infezioni umane (Caprioli et al., 2005).

Il bovino è spesso un *carrier* asintomatico: la letteratura riporta infatti la presenza di tali batteri nell'ambiente della stalla (Thevenot et al., 2005; Kapperud 1991; Besser et al., 2005; Devane et al., 2005). L'eliminazione fecale rappresenta un fattore di rischio per la contaminazione del latte: quando la mungitura non viene eseguita meticolosamente. Per questo motivo è utile indagare la loro presenza non solo nelle deiezioni, ma anche a livello del filtro del latte e nel latte.

I ceppi verocitotossici di *E.coli* nell'uomo possono provocare severe forme cliniche, quali colite emorragica e sindrome uremica emolitica (HUS), soprattutto in bambini e anziani (Ochoa et al., 2003). I ceppi enteroemorragici, sono alla causa di circa 75000 casi d'infezioni umane annue nei soli Stati Uniti, di cui 250 in media si concludono con decessi: di questi l'80% sono dovuti a ceppi STEC, sierotipo O157:H7 (Serna A. et al., 2008). Le possibili fonti d'infezione per l'uomo sono le carni non adeguatamente cotte (Griffin and Tauxe, 1991) e il latte crudo (Herriott et al., 1994). Nel bovino tali ceppi possono far parte della normale microflora enterica e la loro presenza nelle deiezioni sembra legata a diversi fattori tra cui l'età dell'animale: subito dopo lo svezzamento si ha il picco massimo d'escrezione, ma questa può continuare per tutta la vita dell'animale (Paiba et al., 2003).

Due sono i principali fattori di virulenza degli STEC: l'intimina, che promuove la colonizzazione intestinale e le tossine, che diffondono nel circolo sanguigno e inducono danni microvascolari che portano a patologie sistemiche (Serna A. et al., 2008).

Entro alcune ore dall'ingestione, gli *E.coli*/O157:H7 possono già essere individuati lungo il tratto gastroenterico dei bovini, incluso il rumine. Dopo quattro ore dall'inoculazione sperimentale, i microrganismi colonizzano le cellule epiteliali di ileo, cieco, colon, retto e cistifellea in vitelli svezzati. Tale infezione si concentra nella valvola ileo-cieco-colica, anche se non vengono esclusi altri siti (Stamm I. et al., 2008).

L'intimina permette il legame del batterio con le cellule dell'epitelio, causando le cosiddette lesioni AE (attaching and effacing) sulla mucosa intestinale. Il gene

codificante la proteina è l'*eae*, parte di un'isola di patogenicità denominata LEE (locus for the enterocyte effacement) (Yoon J.W. et al., 2008).

I differenti alleli dell'intimina vengono utilizzati sia per la tipizzazione nelle diagnosi di routine, sia per le indagini epidemiologiche: 19 sono infatti i tipi d'intimina, che sembra abbiano tropismi differenti per le cellule di diversi tessuti dell'ospite. Ai ceppi che presentano il gene *eae* sono associate grave diarrea e sindrome uremico-emolitica (Aidar-Ugrinovich L. et al., 2007). Questo anche perché le lesioni AE portano alla distruzione dell'orletto a spazzola dei microvilli tramite il ridimensionamento del citoscheletro, mediante segnali di trasduzione tra cellule batteriche e cellule dell'ospite, adesione profonda dei ceppi all'epitelio e aggregazione di actina polimerizzata nel sito di adesione del batterio.

Ne consegue che la durata dell'eliminazione del batterio con le feci è legata alla velocità di turnover delle cellule epiteliali intestinali (Blanco M. et al., 2005).

Le tossine Shiga-like rappresentano forse il più importante fattore di virulenza, infatti difficilmente si rinviene batteriemia (Serna A. et al., 2008). Per poter arrecare danno infatti le tossine devono passare nel circolo sanguigno: i pazienti infetti da coli O157:H7 spesso liberano leucociti con le feci, come dimostrazione dei danni arrecati dai batteri durante il passaggio al circolo sanguigno. La concomitante infiammazione generale a livello intestinale causata dall'infezione può promuovere l'assorbimento sistemico di tossine (Serna A. et al., 2008).

Le Stx appartengono a due famiglie: Stx1 e Stx2. La famiglia Stx1 è costituita da Stx1, Stx1c e Stx1d; la seconda è rappresentata da Stx2. Stx2c, Stx2d, Stx2e e Stx2f (Gyles C.L. et al., 2004). Di queste le varianti associate alle coliti emorragiche e sindrome uremica emolitica sono le Stx2, Stx2c e Stx2d (Yoon et al., 2008).

Escherichia coli è dotato di una maggiore resistenza agli acidi rispetto agli altri patogeni intestinali, fatto che aumenta la patogenicità, anche in considerazione della bassa dose infettante rispetto agli altri batteri (Gyles C.L. et al., 2004).

2.2 Salmonella spp.

La *Salmonella* è un batterio Gram negativo, con struttura bastoncellare della famiglia delle enterobatteriacee.

Secondo la classificazione di Kauffman-White sono state descritte 2.579 diverse sierovarianti attraverso la sierotipizzazione effettuata sulla variabilità antigenica a livello di porzione lipopolisaccaridica (antigeni O), proteine flagellari (antigeni H1 e H2) e polisaccaridi capsulari (antigeni V) (Malorny et al., 2009). Attualmente la classificazione divide il genere *Salmonella* in 2 specie: *S.bongori*, associata alle infezioni degli animali a sangue freddo e *S.enterica*, cui appartengono tutte le salmonelle patogene per l'uomo.

A livello mondiale *S.enteritidis* e *S.typhimurium* sono i sierotipi più importanti dal punto di vista epidemiologico in quanto responsabili di più dell'80% delle infezioni umane; in Europa, *S.enteritidis* è implicata in più del 60% dei casi di salmonellosi umana (Malorny et al., 2009).

La virulenza e la patogenicità della *Salmonella* dipendono dal sierotipo e dall'ospite coinvolto. *Salmonella* è la principale causa di tossinfezioni alimentari: 1,4 milione di malati, 15000 ospedalizzati e 400 decessi all'anno negli Stati Uniti (Alexander et al., 2009). In Europa nel 2006 sono stati riportati un totale di 160.649 casi confermati di salmonellosi. Tuttavia si stima generalmente che il numero reale di infezioni sia significativamente maggiore (Malorny et al., 2009).

La principale fonte d'infezione per l'uomo è rappresentata dal cibo contaminato: carne di pollo, suino, uova e prodotti a base di uova, sono i cibi più comunemente implicati.

Negli allevamenti l'elevata eliminazione fecale da parte degli infetti e l'accidentale contaminazione degli alimenti per gli animali, rappresentano i più comuni punti d'ingresso della *Salmonella* nella catena alimentare (Malorny et al., 2009). La diffusione dell'infezione è facilitata dall'abilità del microrganismo di sopravvivere per diversi giorni nelle acque sotterranee, nelle acque stagnanti o nell'acqua di mare e per mesi nei cibi contaminati come uova e ostriche (Srikanth et al, 2007).

Nell'uomo i sintomi iniziali sono rappresentati da nausea vomito, seguiti da dolori addominali e diarrea, spesso associati a ipertermia. Nell'1-5% dei casi, le *Salmonella* possono causare patologie sistemiche che possono, se non trattate, concludersi con la morte del soggetto (Malorny et al., 2009). L'enterite è il

sintomo più comune di salmonellosi, tuttavia negli animali si possono manifestare anche setticemia ed aborto (Alexander et al., 2009).

Nel bovino i sintomi clinici si manifestano come enterite acuta, ipertermia, anoressia, depressione e riduzione della produzione latte.

La diagnosi iniziale basata sui segni clinici è spesso confermata da isolamenti di *Salmonella* da feci, tamponi rettali o campioni di tessuto degli animali infetti. Non tutti i bovini infetti manifestano la sintomatologia, che non essendo patogenomica può essere confusa con altre patologie (Alexander et al., 2009).

La maggior parte dei fattori di virulenza della *Salmonella* sono collocati in regioni, cromosomiali definite isole di patogenicità, costituiti da molti loci, che codificano per apparati multiproteici comprendenti proteine effettrici e proteine traslocatici. Queste trasportano le proteine effettrici fuori dal microrganismo e all'interno della cellula intestinale.

Salmonella produce sia endotossine che esotossine. Le endotossine, rappresentate dalla porzione lipidica esterna (lipide A) della parete lipopolisaccaridica di *Salmonella*, portano a diverse risposte biologiche sia in vitro che in vivo. Le esotossine comprendono: le citotossine e le enterotossine. Le citotossine sono così definite per la loro capacità letale nei confronti di cellule eucariote (Von Aste et al., 2005): rilasciate nella cellula infetta ne causano la lisi. Le enterotossine sono responsabili dei sintomi diarroici, con un meccanismo simile a quello della tossina del colera, alla quale è anche strutturalmente simile.

Le fimbrie (anche definite pili) sono strutture filamentose di superficie larghe 2-8 nm e lunghe 0,5-10 µm principalmente costituiti da proteine elicoidali ripetute. Mentre i flagelli, che la maggior parte delle *Salmonelle* possiede in numero tra 5 e 10, sono posizionati in modo random e conferiscono motilità al batterio (Von Aste et al., 2005).

2.3 Staphylococcus aureus

S.aureus è un patogeno normalmente presente sulla cute di diversi mammiferi ed in particolare di uomini e bovini. In medicina le infezioni dovute a questo batterio sono tra le più frequenti e importanti, come le infezioni cutanee e le infezioni iatrogene e nosocomiali (Sung et al., 2008).

Nel bovino rappresenta il principale agente mastidogeno a livello mondiale (Andre M.C.D.P.B. et al., 2008): è responsabile approssimativamente del 30-40% di tutti i casi di mastite riportati (Peles et a., 2007).

Recentemente una nuova tipologia di *S.aureus* si è imposta come importante fonte di infezioni sia in veterinaria, sia in umana, andando ad aumentare le problematiche gestionali delle infezioni a tutti i livelli: i meticillino resistenti (MRSA) (Andre M.C.D.P.B. et al., 2008). Inizialmente riportati solo nell'uomo, negli ultimi anni sono stati segnalati con sempre maggior frequenza negli animali da compagnia e anche da reddito

Hermans nel 2004 ha dimostrato che le diverse fonti batteriche e le diverse modalità di trasporto variano a seconda della specie.

Uno degli habitat principali di *S.aureus* è rappresentato dalle cavità nasali, oltre che della cute, e pertanto questi apparati rappresentano dei fattori di rischio per la sua diffusione: la sua presenza nel cibo è spesso dovuta ad improprie manipolazioni da parte del personale (Andre et al., 2008).

La sua presenza nel latte è dovuta sia alla secrezione diretta dalla mammella con mastite clinica o subclinica, sia attraverso la contaminazione durante la mungitura, sia durante i processi di trasformazione del latte. La presenza di *S.aureus* nel cibo rappresenta un potenziale rischio per la salute pubblica, a seguito della produzione da parte di alcuni ceppi di enterotossine (SE) che se ingerite in quantità sufficiente provocano tossinfezioni (Peles et al., 2007).

Diversi fattori quali il pH, la carica del batterio e la temperatura di conservazione, giocano un ruolo importante nella produzione di enterotossine durante la lavorazione del formaggio. I prodotti dell'industria lattiero casearia rappresentano una fonte di tossinfezioni dato che le SE non si inattivano con la pastorizzazione e restano attive nel cibo per lunghi periodi (Andre et al., 2008).

Diversi sono i fattori di patogenicità degli stafilococchi e possono essere suddivisi in componenti cellulo-associate, ed esotossine (Hermans et a., 2004).

Le componenti cellulo-associate sono rappresentate dalla proteina A, dai polisaccaridi capsulari, da peptidoglicani e acido lipoteicoico.

Le esotossine comprendono gli esoenzimi, le coagulasi, le lipasi le proteasi, ialuronato liasi e ialuronidasi, che interagiscono con le membrane dell'ospite o con il suo sistema immunitario, favorendo l'attecchimento del batterio nell'organismo, le enterotossine e le tossine citotossiche.

Le esotossine infine sono le molecole che determinano le sintomatologie cliniche nei soggetti colpiti.

Enterotossine e toxic-shock syndrome toxin: *S.aureus* secreta enterotossine (SEs) e toxic shock syndrome toxin (TSST-1), due tipi di tossine con attività super antigenica (Hermans et al., 2004).

Le SEs sono una famiglia di esoproteine formate da una singola catena con un peso molecolare che si aggira tra 26000 e 29600 Da. Sono notevolmente resistenti al calore, compresa la pastorizzazione: sono infatti presenti nel cibo anche quando il batterio è stato eliminato dal trattamento termico.

Tradizionalmente sono riconosciute cinque tipologie antigeniche: SEA, SEB, SEC, SED e SEE. Tuttavia recentemente sono state identificate 15 nuovi tipi di SEs: SEG, SEH, SEI, SEJ, SEK, SEL, SEM, SEN, SEO, SEP, SEQ, SER, SEU, SEU2, SEV, oltre alla enterotossina-like (SE1) (Peles et al., 2007). Le enterotossine causano diarrea ed emesi (Hermans et al., 2004). L'abilità di *S.aureus* di crescere e produrre SEs in un ampio range di condizioni è evidenziata dalla varietà di alimenti implicati nelle tossinfezioni da stafilococco. Tuttavia la produzione di SE è limitata ad un numero ridotto di ceppi, e non è sufficiente a determinare una tossinfezione se la carica microbica è bassa (Morandi et al., 2007).

La TSST-1 viene rilasciata nel torrente circolatorio ed è la causa della toxic shock syndrome (TSS). Le enterotossine agiscono come super antigeni, tossine proteiche poiché hanno la capacità di stimolare un'attivazione delle cellule T eccessiva e non convenzionale. Infatti i superantigeni evadono il meccanismo convenzionale di processazione antigenica regolato dal complesso maggiore di istocompatibilità (MHC). Le cellule cui vengono presentati gli antigeni rispondono solo nel caso in cui riconoscono le molecole di classe II e lo specifico frammento di antigene che esse presentano. Al contrario, i superantigeni si legano in modo simultaneo, come proteine non processate, alle molecole del MHC II e ai recettori delle cellule T (TCR), attivando il 20-30% delle cellule T inducendone l'espressione clonale. Al contrario, la presentazione convenzionale

dell'antigene attiva solo lo 0,01% delle cellule T helper dell'ospite. Un ciclo ripetuto di stimolazione cellulare e rilascio di citochine si traduce in un accumulo di queste, che determina un danno tissutale, con rischio di coagulazione intravasale disseminata e disfunzione d'organo (Lappi et al., 2009).

Tossine epidermolitiche: le tossine esfoliative ETA e ATB, prodotte dallo *S. aureus*, causano uno spettro di patologie che spaziano dalla impetigine bollosa alla sindrome della cute scottata, che può portare alla presenza di vesciche estese con perdita di epidermide. Avendo un'attività proteolitica, potrebbero colpire specifiche proteine deputate al mantenimento dell'integrità della cute, ma il meccanismo non è ancora stato chiarito (Hermans et al., 2004).

Emolisine (α, β, γ, δ) e leucocidina: le leucocidine sono esotossine citotossiche per eritrociti e leucociti, inclusi macrofagi e neutrofilii bovini. L'alfa tossina si lega alle cellule, quali piastrine e monociti, mediante uno specifico recettore. In seguito al legame si verifica il rilascio di citochine e mediatori dell'infiammazione (Hermans et al., 2004).

La beta tossina è una sfingomielinasi, che danneggia le membrane ricche in lipidi, ma non è noto altro della sua attività patogena.

La gamma tossina, chiamata anche leucotossina, agisce danneggiando i leucociti e i lipidi di membrana (Hermans et al., 2004).

La tossina delta è una esotossina di basso peso molecolare che forma strutture multimeriche, in grado di lisare molti tipi cellulari. E' di dimensioni ridotte ed è prodotta da quasi tutti i ceppi di *S.aureus* (Hermans et al., 2004). La capacità patogena del batterio si manifesta grazie a tre attività principali: colonizzazione della superficie cutanea e mucosale, mediante elusione del sistema immunitario cutaneo; produzione di citolisine, proteine che lisano la parte cellulare, grazie alle quali possono lisare anche la parete dei linfociti ed infine la produzione di superantigeni, che agiscono a livello sistemico e interagiscono con la risposta immunitaria (Huseby et al., 2007).

Nell'uomo *S.aureus* è causa di diverse infezioni a seconda del distretto colpito e della carica infettante. Si riconoscono lesioni cutanee, articolari, urinarie, respiratorie e sistemiche. La sindrome da shock settico (SST), può condurre alla morte per shock cardiocircolatorio o per coagulopatia intravasale disseminata (CID) (Crepaldi, Barituso 2002). Inoltre è considerato la terza più importante causa al mondo di tossinfezioni alimentari (Peles et al., 2007). Si stima che negli soli Stati Uniti, le tossinfezioni alimentari colpiscono fino ad 80 milioni di persone

l'anno, causando 9000 morti, con un costo complessivo di 5 miliardi di dollari (Peles et al., 2007).

2.4 Listeria monocytogenes

Il genere *Listeria* comprende cinque specie (Czuprynsky et al., 2004):

L.monocytogenes, *L. ivanovii*, *L.innocua*, *L.seeligeri*, *L. welshimeri*. Di queste *L. monocytogenes* è l'unico patogeno in grado di causare un vasto numero di patologie negli animali e nell'uomo. *L.invanovii* condivide sicuramente delle caratteristiche con *L.monocytogenes* ed è occasionalmente associata ad aborto nei ruminanti, tuttavia non è di significativa importanza in altre specie animali e nell'uomo.

L.monocytogenes è un batterio patogeno opportunista, responsabile di diverse patologie, incluse meningite, setticemia, aborto e gastroenterite in uomini ed animali. La *Listeria* ha una notevole capacità di adattarsi e di sopravvivere in ambienti estremi, come ad esempio con concentrazioni elevate di sale (10%NaCl), un ampio range di pH (da 4,5 a 9) e temperaturee comprese tra -1 e 45°C.

L. monocytogenes è ampiamente distribuita nell'ambiente, ed è stata isolata nel suolo, vegetazione, acqua, feci e tessuti di un ampia varietà di specie animali e invertebrati. Il microrganismo è stato isolato da tubature e superfici durante il processo di produzione degli alimenti, anche quando si applicano buone pratiche igieniche (Czuprynsky et al., 2004).

I ruminanti probabilmente mantengono il batterio nell'ambiente mediante il ciclo oro-fecale: il materiale fecale di uccelli infetti può contaminare il suolo, l'acqua e i foraggi con cui i bovini vengono alimentati. Tuttavia epidemie di listeriosi possono verificarsi anche in assenza di alimentazione con insilati, a causa di pascoli di cattiva qualità o vegetali in putrefazione (Brugère-Picoux et al., 2008).

In genere la patologia è più frequente in inverno, probabilmente perché gli animali vengono alimentati a foraggio e perché *Listeria* può crescere a temperature a cui la crescita di altri patogeni è inibita a causa del freddo (Brugère-Picoux et al., 2008). L'incidenza di *Listeria* nel latte varia tra 0,4 e 12,6% ed è massima nei mesi freddi a causa dell'impiego di insilato. Quando il latte crudo è contaminato, generalmente lo è a bassi livelli (<1UFC/ml di latte), ma il livello di contaminazione può aumentare (10^4 - 10^6 UFC/ml di latte) dove ci sono casi di mastite (Linton et al., 2008). Avendo la capacità di crescere a basse

temperature è in grado di moltiplicarsi nel cibo contaminato, come ad esempio nel formaggio e nell'insalata, anche se refrigerati (Kasper et al., 2009).

Per l'uomo le fonti d'infezione sono rappresentate da formaggi a pasta molle, carni non cotte e pesce, probabilmente contaminati durante la lavorazione (Czuprynsky et al., 2004).

Attualmente ogni ceppo di *L.monocytogenes* presente nel cibo è considerato un potenziale patogeno. Il protocollo dell'Unione Europea prevede un massimo di 100UFC di *L.monocytogenes* per grammo di alimento "ready to use" durante la shelf-life, ad eccezione degli alimenti per l'infanzia ed a uso medico, dove esistono tolleranze zero in 25 g di alimento (EU/2073/2005).

Il processo di infezione comprende diversi stadi: adesione ed invasione delle cellule dell'ospite, fuoriuscita dal vacuolo, moltiplicazione intracellulare e passaggio tra le cellule. *L.monocytogenes* aderisce e invade le cellule dell'ospite sia passivamente attraverso fagocitosi, sia attivamente attraverso l'azione di molecole definite intermedine. Queste sono una famiglia di proteine che comprende diversi elementi, che promuovono l'adesione alle cellule dell'ospite, l'internalizzazione ed il passaggio da una cellula a quella contigua. *L. monocytogenes*, entra nella cellula in seguito a fagocitosi, fuoriesce dal vacuolo attraverso l'azione della listeriolisina e della fosfolipasi C (Czuprynsky et al., 2004). Trenta minuti dopo l'ingresso il batterio inizia a distruggere la membrana del fagosoma e, in due ore, circa il 50% della popolazione batterica intracellulare è libera nel citoplasma. Una volta nel citosol il batterio si moltiplica con un tempo di duplicazione di circa un'ora (Vazquez-Boland et al., 2001). *Listeria* ha la capacità di attraversare la barriera intestinale, da dove può disseminarsi negli organi interni come ad esempio fegato e milza (Vazquez-Boland et al., 2001). La traslocazione intestinale avviene senza la formazione di lesioni nel topo, per tanto si può supporre che questa fase non sia indispensabile per un'infezione sistemica (Vazquez-Boland et al., 2001). In seguito alla sua traslocazione intestinale ed il passaggio nel circolo sanguigno, portale o arterioso *Listeria* giunge al fegato o tramite le cellule di Kupffer o per invasione diretta degli epatociti. Conseguentemente si moltiplica nei macrofagi epatici e splenici con il medesimo meccanismo sopra descritto.

Nei ruminanti la patologia è rara ma grave sia nei bovini che negli ovicapri. Determina infatti meningoencefaliti ad esito quasi sempre letale, mielite spinale, aborto, mastite, setticemia e listeriosi gastrointestinale.

L'incidenza della listeriosi umana è bassa, generalmente va dai due agli otto casi all'anno per milione di persone in Europa e negli Stati Uniti (Vazquez-Boland et al., 2001).

Il decorso clinico dell'infezione gastroenterica prevede un esordio circa 20 ore dopo l'ingestione di cibo contaminato; il periodo di incubazione della patologia invasiva è in genere più lungo, all'incirca dai 20 ai 30 giorni (Vazquez-Boland et al., 2001). Si tratta di una patologia di elevata gravità, con un tasso di mortalità del 20-30% nonostante il trattamento precoce (Vazquez-Boland et al., 2001).

Ci sono state grandi epidemie di listeriosi umana, la più grave delle quali si è manifestata negli Stati Uniti per il consumo di un formaggio contaminato perché prodotto con latte contaminato non pastorizzato. Nel 1998 l'epidemia seguì il consumo di vini contaminati sempre negli Stati Uniti, mentre in Italia fu dovuta alla contaminazione di olio di mais distribuito nelle mense scolastiche (Czuprynsky et al., 2004).

La listeriosi clinica si manifesta in donne gravide, con aborti e setticemie, mentre nei soggetti immunodepressi si presenta la meningoencefalite (Czuprynsky et al., 2004). L'infezione fetale può evolvere in una corioamnionite con conseguente aborto generalmente dal quinto mese di gravidanza in poi o la nascita di un feto morto con infezione generalizzata (Vazquez-Boland et al., 2001).

Negli adulti l'infezione evolve in una meningoencefalite accompagnata da disordini del movimento ed in alcuni casi da paralisi dei nervi cranici. Il tasso di mortalità per infezioni del SNC è di circa il 20%, ma può salire al 40-60% se associato a patologie concomitanti e debilitanti (Vazquez-Boland et al., 2001).

Altra forma frequente è quella setticemica, con un tasso di mortalità intorno al 70%; le endocarditi rappresentano la terza forma più frequente, seguite da miocarditi, arteriti, polmoniti, pleuriti, epatiti, artriti, osteomieliti e forme oculari (Vazquez-Boland et al., 2001).

Negli allevatori e nei veterinari sono state segnalate forme generalizzate e cutanee in seguito a pratiche ostetriche. Importante sembra essere la suscettibilità dell'ospite perché di solito i soggetti colpiti sono donne gravide, anziani e soggetti immunodepressi (Brugère-Picoux et al., 2008).

2.5 Campylobacter spp.

Attualmente i campilobatteri sono suddivisi in 15 specie e sei sotto specie, delle quali non tutte patogene: *C. fetus*, *C.jejuni*, *C.coli*, *C.conciscus*, *C.helveticus*, *C.Hyointestinalis*, *C.mucosalis*, *C.lari* e *C.upsaliensis* che sono stati implicati in episodi enterici e riproduttivi degli animali e dell'uomo (Hirsh et al., 2004).

Campylobacter spp. Sono comunemente distribuiti tra gli animali domestici, ma in molti casi vivono come commensali nel tratto intestinale dei mammiferi e degli uccelli.

Campylobacter jejuni è la principale causa di tossinfezioni alimentari nel mondo, insieme a *C.coli* coinvolto nel 5% dei casi; in particolare sono i batteri enterici patogeni più comunemente riportati in medicina umana nel Regno Unito e nella maggior parte del mondo occidentale (Elli-lversen et al., 2009). *C.jejuni* è il più frequente agente eziologico di gastroenteriti batteriche nel mondo industrializzato, con una stima di 2.5 milioni di casi all'anno negli Stati Uniti e di più di 54000 casi riportati dall'United Kingdom public health laboratori service durante il 2001. Rappresenta anche il problema più importante nei paesi in via di sviluppo, particolarmente tra i bambini (Colles et al., 2003). La frequenza delle infezioni da *C.jejuni* è aumentata di sei volte nel Regno Unito dal 1977 al 2000 (Dingle et al., 2003). Nei paesi industrializzati le vie di contaminazione per l'uomo sono rappresentate dalla manipolazione e dal consumo di carne di pollo, prodotti caseari non pastorizzati, di acqua non depurata e il contatto con carcasse di animali da macello (Hudson et al., 1999).

Tra tutte comunque la carne di pollo è la principale fonte di infezione (55-71% dei casi), e solo il 8-14% delle infezioni è dovuta a carne bovina ed il 14-16% a quella ovina.

C.jejuni e *C.coli* comunemente colonizzano i bovini senza causare sintomatologia clinica, rendendo pertanto il bovino un carrier asintomatico: diverse studi riportano che il 40-60% degli animali e l'80% delle mandrie liberano *Campylobacter spp.* (Elli-lversen et al., 2009).

Anche *C.upsaliensis* è causa di sporadiche patologie gastroenteriche nell'uomo, e in questo caso le uniche fonti significative sono rappresentate da cani e gatti, che sono dei portatori sani (Damborg et al., 2008).

Campylobacter spp. può sopravvivere per lunghi periodi nelle fonti d'acqua durante l'inverno, mentre in estate la sua sopravvivenza è limitata dai raggi UV e dalle alte temperature che lo inattivano nell'ambiente esterno.

Gli animali portatori, rappresentano il reservoir del batterio e sono in grado di mantenerlo in ambiente infettando acque e terreni con le loro deiezioni. La trasmissione dagli animali all'acqua può avvenire attraverso la contaminazione del bacino di raccolta con conseguente drenaggio nelle cisterne (Nigard et al., 2004).

C.jejuni è stato spesso isolato dal latte crudo, ed è la principale causa di campilobatteriosi nei paesi in cui si consuma latte crudo.

La forma più comune dell'infezione da *C.jejuni* e *C.coli* è una patologia acuta gastrointestinale auto-limitante, caratterizzata da diarrea e crampi addominali (Butzler, 2004). Il periodo di incubazione è mediamente di 2-5 giorni, ma si stima possa estendersi a 10 giorni. In circa il 50% dei pazienti la diarrea è preceduta da un periodo febbrile con malessere, mialgia, dolori addominali e ipertermia elevata. Sin dal terzo giorno si può presentare sangue fresco nelle feci, accompagnato da muco, indicando quindi un'infezione di colon e retto. Nelle feci si rinviene un quadro infiammatorio con leucocitosi, in cui i batteri sono spesso visibili.

L'emesi è rara, mentre la diarrea persiste per 2-3 giorni mentre lo stato di malessere generale ed i dolori addominali perdurano. Occasionalmente nei giovani, si può sviluppare una peritonite da appendicite acuta, anche se nella maggior parte dei pazienti è presente un'infiammazione in alcuni punti dell'ileo e del digiuno con adenite mesenterica. Raramente si manifestano complicazioni quali colecistite, pancreatite e peritonite (Butzler, 2004).

La batteriemia si manifesta in meno dell'1% dei pazienti, e solitamente è dovuta ad una grave compromissione immunitaria del soggetto. Si possono manifestare anche eritema e artrite reattiva, infezioni extraintestinali, incluse meningite, osteomielite e sepsi neonatale, anche se sono evenienze rare. La più grave complicazione da infezione di *C.jejuni* è la sindrome di Guillain-Barrè (GBS), con un'incidenza di 1/1000 soggetto colpiti (Butzler, 2004).

C.jejuni penetra nella mucosa intestinale del piccolo e grosso intestino mediante le cellule M. L'adesione alle cellule epiteliali è mediata da proteine, quali una fibronectin-binding protein (CadF), una lipoproteina (JlpA), flagelline, i pili e i lipopolisaccaridi di parete. L'adesione alle cellule epiteliali dell'ospite dà inizio agli

eventi che portano allo svilupparsi della patologia. L'internalizzazione del batterio avviene per endocitosi. Le proteine Cia (*Campylobacter spp.* invasion antigen) vengono sintetizzate e secrete al momento del contatto attraverso un sistema di secrezione di tipo III, quindi vengono trasportate nel citoplasma della cellula dell'ospite, dove probabilmente alterano la via di trascrizione delle proteine. Una volta internalizzato, *C.jejuni* è in grado di bloccare il processo fagocitario alterando il fagolisosoma, prevenendo l'acidificazione o gli effetti dei radicali tossici. Queste strategie consentono al batterio di occupare un fagosoma modificato, creando così una nicchia che fornisce nutrienti per favorire la sua sopravvivenza e per proteggerlo dal sistema immunitario dell'ospite (Joens, 2004). I campylobatteri possono essere ritrovati in vacuoli limitati da membrana; essi subiscono un'iniziale riduzione di numero, seguita da una crescita esponenziale per un periodo di 72 ore. Il batterio si muove attraverso l'epitelio intestinale dell'ospite ed ha così modo di accedere alla lamina propria ed alla sottumucosa (Joens, 2004).

2.6 *Yersinia enterocolitica*.

Yersinia è un bacillo Gram negativo, anaerobio facoltativo della famiglia delle *Enterobacteriacee*.

Il genere *Yersinia* comprende microrganismi bastoncellari o coccobacillari, di dimensioni tra gli 0.5 e gli 1.3µm, immobili a 37°C, ma mobili (per la presenza di flagelli peritrichi) se coltivati a temperature inferiori ai 30°C. Sono batteri psicrofili, pertanto crescono anche a basse temperature (4°C). *Y. enterocolitica* viene suddivisa in base agli antigeni O, in oltre 50 sierotipi, molti dei quali non patogeni per l'uomo: i sierotipi riscontrati più frequentemente nei pazienti affetti di yersiniosi sono 4/O:3, 2/O:9, 2/O:5, 27 e 1B/O:8 (Gao et al., 2009). Il sierotipo 4/O:3 rappresenta però la principale responsabile delle infezioni. Recentemente i sierotipi O:1, O:2, O:3, O:5, O:8 e O:9 sono stati associati a manifestazioni cliniche sia in animali che nell'uomo (Gyles, 2004).

Oltre l'antigene somatico O di natura lipopolisaccaridico, *Yersinia* possiede un antigene flagellare H ed un antigene capsulare K. Sono stati individuati 6 diversi antigeni capsulari (da K1 a K6) e numerosi antigeni flagellari H (da "a" a "t").

La principale modalità di trasmissione di *Y. enterocolitica* è rappresentata dagli alimenti, in conseguenza della sua capacità replicativa anche a basse temperature (4°C) e alla sua resistenza per lunghi periodi al di fuori dell'organismo dell'ospite, mantenendo comunque le sue capacità metaboliche (Eisen et al., 2008).

La yersiniosi è associata ad una vasta gamma di manifestazioni cliniche, tra le quali prevalgono quelle enteriche. Circa il 60-70% dei casi di yersiniosi si verificano nei bambini. La sintomatologia più comune è rappresentata da ipertermia, dolori addominali e diarrea, spesso emorragica (Boqvist, 2008).

Il numero di infezioni umane è andato crescendo negli ultimi anni (Oditon et al., 1995), e la presenza di *Yersinia* è ormai accertata in un'ampia gamma di alimenti.

I suini sono il principale reservoir del batterio, pertanto probabilmente la carne di questi animali è il principale veicolo d'infezione per l'uomo se consumata cruda o poco cotta. *Yersinia enterocolitica* è stata associata a diversi focolai d'infezione legati al consumo di latte e prodotti lattiero-caseari e ad acqua contaminata (Kapperud, 1991).

Nel suino, portatore asintomatico, il patogeno si localizza a livello di amigdala, lingua, palato molle, linfonodi e intestino, pertanto anche le feci dell'animale possono costituire un importante fattore di contaminazione ambientale.

In seguito ad ingestione orale, *Yersinia* migra verso l'ileo, il cieco e risale il colon e i tessuti linfatici associati. La malattia clinica presenta vari gradi che vanno da un'infezione acuta e fulminante, ad una lieve infezione cronica. Le lesioni si possono osservare in ogni parte del tratto intestinale. Un aumento del contenuto del fluido intestinale, piccoli noduli sulla superficie della mucosa, lievi erosioni ed ulcere ed essudato fibrinoso. Il digiuno e l'ileo sono i tratti intestinali più colpiti, sebbene anche il cieco ed il colon prossimale possano essere coinvolti. Inizialmente, la colonizzazione di *Yersinia* della mucosa intestinale comporta la formazione di microascessi nella lamina propria. Questi contengono aggregati di coccobacilli e neutrofili che formano masse necrotiche, che possono eventualmente unirsi all'interno delle erosioni della mucosa. I linfonodi mesenterici sono solitamente edematosi. Nel corso di molte infezioni acute, le placche del Peyer sono notevolmente alterate, con colonie di batteri e ascessi necrotici. La formazione dell'ascesso e l'infiltrazione delle cellule infiammatorie, causano una perdita dell'integrità della mucosa, atrofia dei villi intestinali ed ipertrofia delle cripte. Come risultato del danno alla mucosa, la perdita di liquidi porta a diarrea da malassorbimento. La diarrea tende a non essere emorragica a meno di una forma fulminante.

Y. enterocolitica può diffondere nella circolazione sanguigna e giungere ai linfonodi mesenterici ed alle vie linfatiche dove può determinare microascessi epatici, splenici, che possono avere esito letale.

Se è già presente un danno mucosale, conseguenza di parassiti ad esempio, gli animali possono essere predisposti a da una yersiniosi settica.

L'aborto, la nascita di feti morti, le orchite e le infiammazioni dell'epididimo dei ruminanti, possono avvenire come conseguenza della colonizzazione dei coccobacilli a livello intestinale. *Yersinia* invade le caruncole dell'endotelio uterino ed i cotiledoni, giungendo in questo modo al feto. In linea generale l'utero può contenere materiale purulento od emorragico, con ispessimento della placenta e frammenti necrotici nella zona intercotiledonare. Il feto può presentare versamenti toracici ed addominali e microascessi necrotici a livello epatico.

2.7 Prototheca spp.

Al genere *Prototheca* appartengono microalghe unicellulari tassonomicamente molto vicine al genere *Clorella*, ma prive di clorofilla, che ricordano i lieviti e si riproducono formando un numero variabile di sporangiospore all'interno di uno sporangio. Si riconoscono 4 specie, ma solamente *P.wickerhamii* e *P.zopfii*. Delle varie specie classificate, le *P.wickerhamii* è responsabile soprattutto delle infezioni umane, mentre *P.zopfii* colpisce prevalentemente gli animali, in particolare cani e vacche (Pore, 1985).

Tutte le Prototeche sono ubiquitarie e possono quindi avere diversi reservoirs ambientali: si rinvencono nell'erba, nell'acqua dolce e salata, nelle acque nere, ma soprattutto in quelle stagnanti.

La patogenesi di *Prototheca spp.* è ampiamente sconosciuta. Si pensa che nell'uomo l'infezione possa avvenire attraverso il contatto con fonti potenziali o tramite un'inoculazione traumatica.

Sono stati osservati fattori predisponenti locali e sistemici: soggetti con immunodeficienze cellulari sono a rischio protothecosi, ed è stato supposto che difetti quantitativi e qualitativi delle funzioni neutrofiliche, giochino un ruolo importante nella difesa dell'ospite contro *Prototheca spp.* spp.. Infatti i polimorfonucleati ingeriscono e uccidono *P. wickerhamii* (Lass-Flo et al., 2007).

Complessivamente, la patogenicità e la virulenza di *Prototheca spp.* spp. sono moderate, e raramente è considerata un patogeno opportunista.

Nel 1952, *P.zoopfii* fu identificata come patogeno della mastite nei bovini, associata ad una riduzione nella produzione latte, caratterizzata da una leggera secrezione acquosa con coaguli bianchi. (Möller et al., 2007).

La mastite, che continua a rappresentare il principale problema nella vacche da latte, è stata associata sempre più spesso a microrganismi diversi quali funghi e alghe. Va sottolineato che la mastite non solo è un problema sanitario per la bovina, ma è anche in grado di influenzare negativamente l'efficienza economica degli allevamenti e la qualità igienica del latte. In passato sono stati osservati sporadici casi di mastite da *Prototheca spp.*, mentre oggi viene identificata come malattia endemica diffusa in tutto il mondo. Epidemiologicamente i paesi più colpiti sono il Brasile, gli Stati Uniti e la Germania.

Il rischio d'insorgenza d'infezione è strettamente correlato con la presenza in allevamento di fattori predisponenti, quali una scarsa igiene ambientale ed un'insufficiente igiene della mungitura. Contrariamente alle mastiti causate da altri microrganismi, quelle dovute a *Prototheca spp.*, sono caratterizzate da una reazione infiammatoria moderata, di tipo granulomatoso che causa una riduzione della produzione di latte e un incremento del volume dei quarti infetti, una secrezione acquosa e spesso l'atresia del quarto infetto (Roesler et al., 2003). Grazie alla loro capacità di penetrare sopravvivere all'interno dei macrofagi e di invadere il tessuto mammario, queste alghe sono responsabili di infezioni persistenti e essendo anche resistenti ai trattamenti antibiotici. Perciò il controllo dell'infezione si basa attualmente solo sull'eliminazione dei soggetti positivi.

Negli ultimi anni l'attenzione della comunità scientifica è stata attratta dalla potenziale efficacia antimicrobica degli oli estratti da piante essenziali: è stato infatti dimostrato che diverse specie, fra cui *Malaleuca alternifolia* (tea-tree) e *Citrus bergamia* (bergamotto) sono caratterizzate da un elevato potere antimicrobico (Piccinini et al., 2008).

2.8 *Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis*

L'agente eziologico della paratubercolosi bovina è il *Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis* (MAP) appartenente all'ordine *Actinomycetales*, famiglia delle *Mycobacteriaceae*, genere *Mycobacterium*.

Sono batteri a forma di bastoncini di dimensioni 0.5-1µm, solitamente riuniti a palizzata o a grappolo (Timoney *et al.*, 1995). Sono immobili, aerobi, non sporigeni, fortemente acido-resistenti, anche se negli ultimi anni sono state isolate forme solo debolmente colorate con lo Ziehl-Neelsen perché prive di una vera parete, chiamati sferoplasti (Wall *et al.*, 1993).

MAP appartiene ai micobatteri a lenta crescita non fotocromogeni, la sua crescita richiede da 8 a 16 settimane (in casi limite fino a 6 mesi) e necessita di micobactina in quanto il batterio non è in grado di produrre questo sideroforo chelante il ferro (McIntire e Stanford, 1986). E' un microrganismo relativamente inerte dal punto di vista biochimico, la sua identificazione è basata principalmente sulla dipendenza dalla micobactina, la lenta crescita e la presenza dell'IS900 evidenziata mediante PCR.

Lovell *et al.* (1944) hanno riportato la possibilità di isolare il microrganismo per più di 9 mesi da acqua stagnante sterilizzata (pH 5.5), Larsen *et al.* (1956) hanno riportato la sopravvivenza di MAP in campioni di acqua di rubinetto, a vari valori di pH, a temperature di 38°C in assenza di luce: è stato possibile isolare il batterio fino a 14-17 mesi, dipendentemente dal pH dell'acqua. Il batterio è stato in grado di sopravvivere per 48 settimane nell'acqua dell'abbeveratoio posizionato in un luogo ombroso e 36 settimane nell'acqua dell'abbeveratoio esposto direttamente alla luce solare, in entrambi i casi il microrganismo ha resistito per ulteriori 3 mesi nel sedimento (Whittington *et al.*, 2005). Whittington *et al.* (2004) simulando una serie di condizioni ambientali che possono essere presenti nei pascoli e che possono influenzare la sopravvivenza del batterio: MAP è stato isolato per oltre 55 settimane da pellet fecali in luoghi riparati dalla radiazione solare diretta mentre l'umidità e il pH del terreno non hanno influito sulla sopravvivenza del batterio.

La paratubercolosi ha una diffusione cosmopolita (Cocito *et al.*, 1994) e sembra coinvolgere un numero sempre crescente di animali. Il rapporto OIE del 1998

sullo stato e il controllo della paratubercolosi segnala la presenza o il sospetto di malattia in circa la metà dei paesi che forniscono dati (OIE, 1999). Anche se la paratubercolosi è presente in molti paesi, essa è probabilmente sottostimata per le difficoltà di diagnosi e il lungo periodo di incubazione. La diffusione dell'infezione e la sua vera prevalenza rimangono poco chiare e di conseguenza le stime sulla prevalenza della paratubercolosi negli allevamenti di bovini in Europa variano dal 7 al 55% (Manning e Collins, 2001). In Austria la positività è stata calcolata pari al 2% dei bovini e al 7% degli allevamenti (Gasteiner *et al.*, 1999) mentre in Belgio il 18% degli allevamenti di bovini e l'1,2% degli animali testati, ha dato esito positivo (Boelaert *et al.*, 1999). La prevalenza aumenta in Olanda (54,7% degli allevamenti e 2,5% degli animali infetti) (Muskens *et al.*, 2000) e in Spagna (67% degli allevamenti positivi) (Bakker *et al.*, 2000). In Danimarca sono stati testati 700 allevamenti, nel 70% dei casi erano presenti anticorpi nel latte di massa (Nielsen *et al.*, 2000). Per quanto riguarda l'America, nel Wisconsin la prevalenza è calcolata al 7,3% nei bovini e al 50% negli allevamenti (Collins *et al.*, 1994). In Victoria, Australia, 1800 allevamenti su 8100 sono risultati positivi (Whittington e Sergeant, 2001) mentre in Nuova Zelanda il 60% degli allevamenti (Kennedy e Benedictus, 2001). La Svezia ed alcune regioni dell'Australia sono le uniche aree che si possono considerare paratubercolosi-free. (Bakker *et al.*, 2000).

Per quanto riguarda l'Italia pochi sono gli studi effettuati, Robbi *et al.* (2002) riportano una sieroprevalenza nella regione Veneto pari al 27% nei bovini.

La paratubercolosi ha un ciclo oro-fecale, la principale fonte di infezione è rappresentata dalle feci e dal latte di animali infetti. La quantità di batteri eliminati con le feci dipende dallo stadio dell'infezione, nella forma clinica è stata calcolata a 10^6 - 10^{10} ufc/g (Chiodini *et al.*, 1984a; Whittington *et al.*, 2000). Il rischio maggiore dunque, in un allevamento è rappresentato da animali adulti con l'infezione in uno stadio avanzato anche se negli ultimi anni il ruolo dei giovani è stato rivalutato (Weber *et al.*, 2005), come indicato anche da modelli matematici di simulazione della trasmissione dell'infezione (Mitchell *et al.*, 2005).

Inoltre, è possibile la disseminazione del batterio in altri sedi oltre l'intestino (Sweeney, 1996) quali la mammella, l'utero e il parenchima testicolare rendendo così possibile la sua eliminazione a partire da questi organi (Bakker *et al.*, 2000).

L'escrezione del batterio con il latte avviene soprattutto negli ultimi stadi dell'infezione anche se è documentata la presenza di MAP nel latte di animali con la forma subclinica (Sweeney *et al.*, 1992; Streeter *et al.*, 1995) con una prevalenza attorno al 19%, 11% e 3% per gli animali eliminatori fecali forti medi e bassi rispettivamente (Sweeney *et al.*, 1992).

La via principale di infezione è rappresentata dall'ingestione di materiale contaminato. La contaminazione della mammella con feci e la presenza di MAP nel colostro e nel latte sarebbero responsabili negli animali giovani dell'ingestione di grandi quantità di micobatteri (Bakker *et al.*, 2000; Manning e Collins, 2001; Kennedy e Benedictus, 2001). Le fonti di MAP più comuni sono rappresentate da: 1) colostro e latte materno o di vacche infette 2) mammelle, cute, superfici e attrezzi contaminati da feci 3) insilati e fieno contaminati.

In seguito ad ingestione il batterio si stabilisce nei macrofagi della mucosa intestinale. L'evoluzione dell'infezione è influenzata da diversi fattori come l'età, le condizioni generali di salute dell'animale, fattori genetici, la dose infettante e soprattutto dalla risposta immunitaria dell'ospite che sembra avere il ruolo predominante nella patogenesi (Clarke, 1997).

Una parte degli animali che entrano in contatto con il batterio elimina l'infezione mediante una risposta immunitaria adeguata (Perez *et al.*, 1996; Sigurdardottir *et al.*, 2004). Degli animali infetti invece, la maggior parte è in grado di controllare l'infezione, mentre soltanto un 10-15% sviluppa la malattia (Olsen *et al.*, 2002). I soggetti con la forma subclinica rimarranno infetti per il resto della loro vita e saltuariamente elimineranno il batterio con le feci contribuendo alla diffusione dell'infezione.

La massima recettività all'infezione si ha negli animali con meno di un anno di età (Olsen *et al.*, 2002), anche se l'infezione sperimentale di animali adulti dimostra che l'immunità non è mai assoluta (Tessema *et al.*, 2001). La maggiore recettività dei giovani potrebbe dipendere sia da un incompleto sviluppo del sistema immunitario, sia da un più facile accesso del batterio nella mucosa intestinale attraverso le placche di Peyer. Il tessuto linfoide dell'intestino, molto sviluppato nei primi mesi di vita, si atrofizza con l'età (Manning e Collins, 2001).

In seguito all'ingestione, MAP arriva nell'intestino tenue e si stabilisce nella mucosa intestinale: il tempo di passaggio dal lume all'interno della mucosa è breve, nelle infezioni sperimentali per via orale è stato possibile isolare MAP dalla mucosa poche ore dopo la somministrazione (Weigand e Goethe, 1999). La porta d'ingresso per i bacilli sembrano essere le cellule M (Momotami *et al.*, 1988; Sigurdadottir *et al.*, 2001) che si trovano nell'epitelio sovrastante il tessuto linfoide organizzato (GALT) dell'ileo e del digiuno: si tratta di cellule epiteliali specializzate che hanno la funzione principale di saggiare e trasportare diversi antigeni dal lume intestinale ai macrofagi sottostanti dove vengono processati inducendo l'immunità e/o l'immunotolleranza verso gli antigeni alimentari (Tessema *et al.*, 2001). I batteri entrano nelle cellule M mediante endocitosi e poi vengono trasportati, all'interno di vacuoli, ai macrofagi presenti nelle aree intraepiteliali e sottoepiteliali delle placche di Peyer e della vicina lamina propria (Momotami *et al.*, 1988). La localizzazione delle lesioni precoci nel tessuto linfoide della mucosa (Sigurdadottir *et al.*, 2004) sembra dare credito a questa ipotesi anche se studi recenti dimostrano l'uptake di MAP anche da parte degli enterociti (Sigurdadottir *et al.*, 2005).

Il meccanismo di adesione e di internalizzazione nelle cellule M sono in gran parte sconosciuti ma non sembra sia richiesta la formazione di un legame specifico (Secott *et al.*, 2002; Secott *et al.*, 2004). Inoltre, Secott *et al.* (2001) hanno dimostrato che il trattamento di MAP a pH acido aumenta la sua capacità di legare la fibronectina e hanno quindi proposto l'attivazione del batterio nell'ambiente acido dello stomaco.

MAP sembra inibire la produzione di TNF α (Aho *et al.*, 2003; Coussens *et al.*, 2004; Lee *et al.*, 2001) importante nell'attivazione dei macrofagi e la formazione del granuloma: il continuo richiamo di macrofagi in condizioni di apoptosi diminuita e attivazione non corretta portano alle caratteristiche lesioni granulomatose diffuse presenti nella paratubercolosi. L'infiltrazione dei tessuti infetti con un elevato numero di cellule porta all'ispessimento e alla corrugazione della mucosa intestinale soprattutto a livello dell'ileo (Clarke, 1997). I macrofagi infetti possono occasionalmente entrare nel circolo ematico, con conseguente formazione di lesioni granulomatose in sedi diverse dall'intestino come il fegato, i reni, i polmoni (Clark, 1997). Le lesioni tipiche sono quelle di un'enterite granulomatosa con cellule epitelioidi e macrofagi che invadono la lamina propria

e la sottomucosa e sono piene di bacilli acido-resistenti (Sigurdottir *et al.*, 1999). Inoltre, si ha il coinvolgimento dei linfonodi regionali e la dilatazione dei vasi linfatici della sierosa intestinale (cording). Queste lesioni portano ad alterazioni anatomiche e funzionali dei tessuti che sono responsabili dei principali sintomi della malattia come il malassorbimento, la diarrea, l'ipoproteinemia, e il dimagrimento fino alla cachessia e la morte.

3. MORBO DI CROHN

Attualmente metà della letteratura inerente questa patologia, sostiene il ruolo di MAP quale principale agente eziologico pertanto abbiamo ritenuto importante indagare la presenza di MAP nel corso dello studio quale possibile agente zoonosico.

La malattia prende il nome da un articolo pubblicato da Crohn nel 1932 (Bakker *et al.*, 2000) e assieme alla colite ulcerativa forma un complesso chiamato malattie infiammatorie dell'intestino (Inflammatory Bowel Diseases).

Il morbo di Crohn colpisce solitamente i soggetti di età compresa fra 15 e 25 anni (Chiodini e Rossiter, 1996) anche se esiste un picco minore fra i 55-65 anni (Chacon *et al.*, 2004). La prevalenza della malattia è maggiore nel mondo industrializzato (UE, 2000) e nelle aree urbane mentre una certa familiarità è stata descritta. (Grant, 2005) L'incidenza media in Europa è 5.6 casi per 100.000 abitanti e sembra essere in aumento (UE, 2000).

La malattia è caratterizzata da un'infiammazione cronica transmurale della parete intestinale, che può coinvolgere il mesentere e i linfonodi regionali. L'intestino appare ingrossato, la mucosa è edematosa con ulcerazioni longitudinali e trasversali e aspetto cerebroide, il mesentere corrispondente è ispessito ed edematoso e i linfonodi regionali sono ingrossati. L'infiammazione transmurale, l'edema, le ulcerazioni e la fibrosi sono spesso responsabili della formazione di stenosi, fistole e ascessi. La caratteristica fondamentale delle lesioni macroscopiche è la netta demarcazione del tratto colpito. Le lesioni microscopiche sono caratteristiche di un'infiammazione granulomatosa che coinvolge tutti gli strati della parete intestinale senza segni di caseificazione. Nei granulomi sono presenti macrofagi, linfociti, cellule giganti e cellule epitelioidi (UE, 2000).

I principali sintomi sono perdita di peso, dolori addominali, sensazione di pesantezza nel quadrato inferiore destro dell'addome, diarrea intermittente oppure costipazione dovuta a stenosi del lume intestinale, vomito e malessere generalizzato (Chacon *et al.*, 2004). Lo sviluppo di fistole o ascessi comporta febbre e dolore. Circa l'80% dei pazienti richiede l'intervento chirurgico per complicazioni e circa l'80% di questi pazienti va incontro a recidive per cui la qualità della vita è compromessa (Chiodini e Rossiter, 1996). Non esiste una

cura, la terapia è soltanto sintomatica con somministrazione di antidiarroici, antinfiammatori, immunosoppressivi (Grant, 2005).

Anche se l'eziologia del morbo di Crohn rimane ignota, si sospetta un'origine multifattoriale. Una serie di teorie sono state sviluppate negli anni che includono: A) la continua stimolazione del sistema immunitario per un'infezione persistente oppure per una barriera intestinale difettosa, B) il malfunzionamento del sistema immunitario con perdita della tolleranza, attivazione cellulare e disordini nell'apoptosi, C) fattori genetici e D) una combinazione dei fattori sopra descritti (Grant, 2005).

L'ipotesi odierna più accreditata è che in soggetti geneticamente predisposti i fattori esogeni (agenti infettivi, flora intestinale, alimenti) ed endogeni (epitelio intestinale, ormoni) concorrono nel mantenere uno stato cronico di erronea risposta immunitaria eventualmente aggravato da fattori ambientali (fumo, sostanze chimiche) (Chacon *et al.*, 2004).

Nel 2001 è stato localizzato un gene nel cromosoma 16 chiamato NOD2/ (Hampel *et al.*, 2001; Hugot *et al.*, 2001; Ogura *et al.*, 2001) con 3 alotipi collegati alla malattia R702W, G908R, L1007fs (Lesage *et al.* 2002): in soggetti portatori il rischio di sviluppare il morbo di Crohn è 1.5-4 volte maggiore mentre in soggetti omozigoti il rischio è 15-40 volte maggiore (Chacon *et al.*, 2004). La funzione del gene non è ben nota, sembra che esso codifichi per una proteina coinvolta nel riconoscimento di muropeptidi batterici e nell'attivazione della via NFκB (Inohara, 2003). Esperimenti su topi *knockout* per il gene hanno mostrato come il ruolo di NOD sia probabilmente legato alla regolazione della risposta del sistema immunitario (Pauleau e Murray, 2003).

La scoperta di questo gene non esclude la partecipazione di altri fattori: secondo Greenstein *et al.* (2003), nelle popolazioni geneticamente predisposte sono più propense a sviluppare la malattia quando esposte ad agenti infettivi. Sechi *et al.* (2005) riportano come il 51.35% di pazienti esaminati fossero portatori di almeno una mutazione per il gene rispetto al 20% dei controlli e come il 73.7% dei pazienti portatori fosse positivo per MAP. Secondo gli autori la risposta immunitaria contro MAP in soggetti portatori sarebbe inadeguata permettendo lo stabilirsi di un'infezione.

Escherichia coli è il batterio predominante nell'intestino, dove gioca un ruolo importante nel promuovere la stabilità della flora luminale e dell'omeostasi d'organo. Nei pazienti affetti da Crohn, sono state osservate modificazioni della concentrazione luminale batterica, infatti l'ileo è risultato completamente colonizzato da *E.coli* (Lederman et al., 1997; Neul et al., 2002), che predominava abnormemente (tra il 50 ed il 100%) sul numero totale sia degli aerobi che degli anaerobi, formando un biofilm sulla parete intestinale (Darfeuille-Michaud et al., 1998; Swidsinski et al., 2002).

Analizzando i fattori di patogenicità dei ceppi, è stata osservata una notevole capacità adesiva, che permette loro di colonizzare la mucosa e di resistere alla rimozione meccanica ad opera della peristalsi intestinale. Inoltre è stata notata una certa correlazione tra l'adesione batterica e la colonizzazione mucosale (Darfeuille-Michaud et al., 1998).

Tra questi il ceppo di *E.coli* LF82, evidenziato frequentemente nelle lesioni di questa patologia, manifesta elevate capacità invasive e per questo motivo è stato ascritto al gruppo degli AIEC (Bordeaux et al., 1999). L'alta capacità di replicazione di questi ceppi all'interno dei macrofagi, che permette loro di attraversare la mucosa intestinale ed indurre una risposta infiammatoria cronica, potrebbe essere coinvolta nella formazione dei granulomi infiammatori.

La prima associazione sperimentale fra MAP e morbo di Crohn è stata dimostrata da Chiodini *et al.* (1984b) con l'isolamento da pazienti di sferoplasti micobatterio-simili, successivamente identificati come MAP. Questi batteri, hanno impiegato 18 mesi per crescere in coltura e 5 anni per trasformarsi nella forma acido-resistente e una volta inoculati in capre hanno dato lesioni granulomatose a livello dell'ileo distale (van Kruiningen *et al.*, 1986). Gli strumenti usati negli anni a seguire per dimostrare questa associazione sono stati: 1) la coltura di dai tessuti dei pazienti, 2) l'utilizzo di tecniche di biologia molecolare, 3) l'utilizzo della sierologia e 4) l'applicazione di protocolli terapeutici con sostanze antibatteriche.

Secondo Chiodini e Rossiter (1996) i dati a favore della correlazione tra MAP e il morbo di Crohn sono:

le somiglianze delle due malattie

la coltivazione del batterio da pazienti affetti dal morbo di Crohn

la capacità degli isolati umani di dare la malattia negli animali

il riscontro di positività per l'IS900 in pazienti

I dati a sfavore di questa correlazione sono:

il basso tasso di colture positive

la variabilità nei dati della PCR

il ritrovamento di positività per l'IS900 nei controlli

Tuttavia il miglioramento delle metodiche impiegate per la ricerca di MAP ha permesso negli ultimi anni un maggiore tasso d'identificazione del batterio nei pazienti infetti rispetto ai controlli (Grant, 2005). Grazie al sistema MGIT il tasso di isolamento di MAP ha raggiunto l'86% nei tessuti recisi e il 42% nelle biopsie rispetto al 9% dei controlli (Bull *et al.*, 2003a). MAP è stato isolato anche da un paziente con una linfadenite non tubercolare resistente ai trattamenti antitubercolari il quale dopo 5 anni ha sviluppato il morbo di Crohn (Hermon-Taylor *et al.*, 1998). La presenza di MAP come sferoplasta spiegherebbe perché non sono visibili bacilli-acido resistenti in lesioni del morbo di Crohn. MAP è stato isolato da lesioni in diversi paesi e anche da latte di donne con il morbo di Crohn (Naser *et al.*, 2000) e recentemente dal sangue di pazienti affetti dal morbo (Naser *et al.*, 2004).

MAP è stato isolato da tessuti recisi di pazienti con il morbo di Crohn: Chiodini *et al.* (1984b) furono i primi ad isolare il batterio sotto forma di sferoplasti ossia senza parete cellulare.

La quasi totalità degli studi utilizza l'IS900 come target per la ricerca di MAP con risultati per tanti anni contraddittori. Le difficoltà di evidenziare MAP negli studi meno recenti potrebbero essere dovute alle metodiche utilizzate in passato poiché la parete di MAP è molto resistente e quindi per rendere disponibile il DNA bisogna effettuare una lisi meccanica. Per questo motivo negli studi che non hanno usato questo tipo di lisi la sensibilità potrebbe essere stata non ottimale (Chacon *et al.*, 2004). In lavori recenti le percentuali di positività riportate per i pazienti sono maggiori rispetto ai controlli (Collins *et al.*, 2000) e Bull *et al.* (2003a) hanno addirittura riscontrato una positività nel 92% dei campioni prelevati da soggetti con il morbo di Crohn rispetto al 26% di positività nei controlli.

Presenza del batterio nel latte e nei formaggi

Il latte rappresenta un veicolo per la trasmissione di MAP all'uomo: il batterio può entrare in mammella per via ematica a partire dalla localizzazione intestinale, oppure il latte può essere contaminato con le feci (Collins *et al.*, 2001). Secondo Spahr e Schafroth (2001) i bovini e gli ovini possono eliminare MAP con il latte in concentrazioni di 2-8 UFC/50ml tuttavia, visto che il materiale fecale degli animali con la forma clinica può contenere fino a 10^8 - 10^9 UFC/g (Kennedy e Benedictus, 2001), la contaminazione fecale può avere un ruolo più importante nella presenza del microrganismo nel latte crudo rispetto all'eliminazione diretta del batterio. Le stime riguardo la carica di MAP nel latte, sono comprese fra <1 ufc/ml e 250 UFC/ml (Pearce *et al.*, 2001; Ayele *et al.*, 2005), fino a valori superiori a 10^4 UFC/ml (Grant *et al.*, 1996).

Millar *et al.* (1996) hanno evidenziato positività alla PCR per MAP nel latte pastorizzato in commercio ed hanno ipotizzato che il microrganismo sopravviva alla pastorizzazione. Successivamente diversi studi hanno dimostrato la presenza del DNA di MAP nel latte (O'Reilly, 2004) e a partire dal 2001 è stato possibile coltivare il batterio da latte pastorizzato (Grant *et al.*, 2002a; Ayele *et al.*, 2005; Ellingson *et al.*, 2005).

La riduzione decimale della carica di un patogeno richiesta in un processo di pastorizzazione è determinata dai seguenti fattori: 1) patogenicità del microrganismo 2) dose infettante e il possibile effetto cumulativo di dosi ripetute 3) numero di batteri che si possono trovare nel latte 4) capacità dei batteri di moltiplicarsi in condizioni di stoccaggio 5) quantità di prodotto pastorizzato consumato

Attualmente non sono disponibili informazioni definitive circa la patogenicità di MAP nell'uomo, così come la dose infettante e il possibile effetto cumulativo, dunque, la riduzione decimale necessaria per ritenere la pastorizzazione sicura dovrà essere postulata in base a un giudizio soggettivo. E' comunque importante considerare una serie di parametri che possono influenzare l'inattivazione termica del batterio come riportato da Klijn *et al.* (2001):

Sung e Collins (2000) hanno valutato il tasso di diminuzione di MAP (espresso in valore D) nel formaggio: hanno preparato un formaggio a pasta molle (Queso

fresco) usando latte pastorizzato inoculato con 10^6 UFC/ml di ceppi di MAP non trattati termicamente e ceppi trattati a 62°C per 240 secondi prima dell'inoculazione. Nel formaggio in cui MAP non era stato trattato termicamente il valore D era di 59.9 giorni, nell'altro caso invece, il valore D è stato calcolato a 36.5 giorni.

Spahr e Schafroth (2001) hanno studiato la sopravvivenza di MAP nel formaggio prodotto a partire da latte crudo utilizzando 2 ceppi, uno isolato da feci di bovino e uno isolato da latte. Per ogni ceppo sono stati preparati 2 formaggi a pasta dura (Emmentaler) e 2 formaggi a pasta semi-dura (Tilsiter) secondo procedure tradizionali.

Gli autori hanno osservato per entrambi i tipi di formaggi una lenta ma costante riduzione delle cariche micobatteriche durante tutta la durata dell'esperimento. Dopo 90 e 120 giorni, alla fine della maturazione, non è stato possibile isolare MAP dai due formaggi a pasta dura, al contrario del formaggio a pasta semidura. I valori D sono stati calcolati rispettivamente a 27.8 e 45.5 giorni.

Risultati analoghi sono stati ottenuti da Donaghy *et al.* (2004), che hanno utilizzato 3 ceppi di MAP a due concentrazioni diverse. Nelle forme con basse concentrazioni (10^{1-2}) di MAP è stato possibile isolare il batterio fino a 18 settimane mentre in presenza di elevate concentrazioni (10^{4-5}) MAP era isolabile fino al termine delle 27 settimane. I valori D calcolati per i 3 ceppi erano di 107, 96 e 90 gg .

Ikonomopoulos *et al.* (2005) hanno effettuato la ricerca di MAP tramite PCR e coltura in formaggi venduti al dettaglio in Grecia e Repubblica Ceca. Sono stati esaminati 84 campioni comprendenti 5 marchi di formaggio feta e 3 di formaggio ceco. Ha mostrato positività alla PCR il 50% dei formaggi greci e il 12% di quelli cechi con una variazione da 0 al 85% in base al marchio, dimostrando per la prima volta la presenza di MAP vitale in formaggi presenti in commercio, fra cui anche un formaggio a pasta dura.

Dalla possibile correlazione fra MAP e morbo di Crohn sorgono quesiti di sanità pubblica che riguardano la trasmissione del micobatterio all'uomo sia direttamente sia mediante i prodotti di origine animale quali il latte e i suoi derivati, la carne ma anche altri fonti come l'acqua (Collins, 1997).

Diversi paesi hanno chiesto una presa di posizione sull'argomento al comitato scientifico della comunità europea "Animal Health and Animal Welfare" che nel 2000 ha pubblicato un rapporto ribadendo la mancanza di dati sufficienti per confermare o negare l'ipotesi di una possibile correlazione fra MAP e morbo di Crohn (UE, 2000). Nel rapporto viene sottolineato come il batterio sia piuttosto diffuso e sia quindi probabile che tante persone siano venute in contatto con esso: il fatto che sia rinvenuto con una frequenza maggiore nei pazienti con il morbo di Crohn rispetto ai controlli suggerisce che il batterio possa avere un ruolo nella malattia sia come agente eziologico sia come un invasore secondario che aggrava la malattia, sia come un colonizzatore non patogeno che approfitta delle alterazioni a carico dell'intestino per stabilirsi in questa sede. L'esposizione dell'uomo ad alti livelli del batterio può avvenire per contatto diretto con animali infetti o bevendo latte crudo di animali infetti, l'esposizione a bassi livelli potrebbe essere conseguente al consumo di latte pastorizzato o ad altre fonti come la fauna selvatica. Non sembra esistere una relazione diretta tra l'esposizione (ad alti o bassi livelli) al batterio e lo sviluppo del morbo di Crohn ed è anche possibile che il suo coinvolgimento interessi solo parte dei casi (UE, 2000).

Come risposta ai rapporti preliminari di isolamento di MAP da latte in vendita al dettaglio nel Regno Unito la "Food Safety Authority dell'Irlanda" (1998) ha annunciato le seguenti raccomandazioni: 1) il latte di animali infetti non dovrebbe essere somministrato ad altri animali ma eliminato. 2) il latte crudo da allevamenti con paratubercolosi non dovrebbe essere destinato al consumo umano o la caseificazione.

4. LEGISLAZIONE

La qualità microbiologica costituisce un requisito di base del latte, sia di quello destinato a latte alimentare che di quello avviato alla trasformazione. La carica batterica del latte è soggetta a precisi limiti di legge per il latte commercializzato, oltre ad essere uno dei parametri su cui si basa il pagamento differenziato del latte in funzione della qualità. In Europa il limite legale è stabilito dal regolamento CE n. 853/2004 che stabilisce norme specifiche in materia di igiene per gli alimenti di origine animale. In questo documento si definisce “latte crudo” il latte prodotto mediante secrezione della ghiandola mammaria di animali di allevamento che non è stato riscaldato a più di 40°C e non è stato sottoposto ad alcun trattamento avente un effetto equivalente. A questo tipo di latte si richiede di soddisfare i seguenti requisiti:

Tenore di germi a 30°C (per ml)	≤ 100 000 (*)
Tenore di cellule somatiche (per ml)	≤ 400 000 (**)

Pertanto in Europa il limite legale per il contenuto in germi del latte è di 100.000 UFC/mL, calcolato come media geometrica di almeno quattro campioni eseguiti in due mesi successivi. Più recentemente la Regione Lombardia ha fissato un limite di 25.000 UFC/mL per il latte crudo destinato alla vendita diretta al consumatore (Circolare 19/SAN 07).

Con il D.L. 24 giugno 2004, n.157 (convertito con legge di conversione 3 agosto 2004, n.204) lo Stato italiano, abrogando l'articolo1 della legge del 3 maggio 1989, n.169 e contrariamente alla possibilità data dal regolamento 853/2004, ha eliminato il divieto di vendita del latte crudo (Circolare 23 Dicembre 2008). Pare evidente che tale determinazione, sostanzialmente in controtendenza rispetto al divieto imposto nel passato (Legge3 maggio 1989, n.169) e rispetto alle possibilità date dalla normativa comunitaria di mantenere in vigore tale divieto (Regolamento Ce n.853/2004), sia stata adottata a seguito della valutazione di dati e informazioni epidemiologiche e sanitarie disponibili in quel momento (Circolare 23 dicembre 2008).

All'eliminazione del divieto della vendita di latte crudo non è seguita una regolamentazione da parte dello Stato, che disciplinasse la conseguente liberalizzazione della vendita (solo a gennaio 2007 è stato adottato l'Accordo

Stato Regioni) (Circolare 23 dicembre 2008). In questa situazione di vuoto normativo, la Regione Lombardia, ha ritenuto opportuno disciplinare le modalità di produzione e vendita di latte crudo emanando una serie di Circolari a partire dalla circolare 39/SAN del 17 novembre 2004 (successivamente modificata e integrata con Circolare 20/SAN del 24 maggio 2005, Circolare 13/SAN del 13 aprile 2007 e Circolare 19/SAN del 28 giugno 2007) che hanno previsto le varie possibili modalità di vendita, le modalità autorizzative delle aziende, i requisiti sanitari degli animali, i requisiti per la mungitura e lo stoccaggio del latte, i criteri igienico sanitari del latte crudo destinato alla vendita per il consumo diretto, i requisiti degli erogatori automatici, le procedure di stoccaggio, trasporto e gestione del latte crudo, le modalità di controllo ufficiale, le informazioni al consumatore (Circolare 23 dicembre 2008).

Di seguito sono riportati i punti salienti della circolare 19/SAN del 28 giugno 2007, riguardante i requisiti del latte crudo destinato alla vendita al consumatore finale.

1. Tenore in germi a 30°C(per ml) inferiore o uguale a 25.000, mentre nella circolare precedente la carica batterica dovrebbe avere < 50.000;
2. titolo di cellule somatiche (per ml) inferiore o uguale a 300.000;
3. assenza di germi patogeni e le loro tossine;
4. residui di sostanze inibenti: non superiori ai limiti fissati negli allegati I e II del regolamento CEE n.2377/90.

Parametro	Limite accettabilità	Metodica ufficiale
Tenore in germi a 30°C	Inferiore o uguale a 25000/ml	
Titolo cellule somatiche	Inferiore o uguale a 30000/ml	
Residui sostanze inibenti	Non sup a allegati I e II	
<i>Listeria monocytogenes</i>	Assente in 25 ml	PCR
<i>Salmonella spp.</i>	Assente il 25 ml	PCR
<i>Campylobacter spp. termotolleranti</i>	Assente il 25 ml	PCR
<i>Streptococcus agalatiæ</i>	Assente	Esame culturale
<i>E.coli</i> O157	Assente il 25 ml	PCR
Stafilococco coag. positivi	Minore di 100UFC/ml	Es. culturale con numerazione

In caso di superamento dei limiti indicati, il responsabile dell'azienda agricola, provvede, non appena a conoscenza dell'esito delle analisi che evidenziano la non conformità e senza attendere ulteriori comunicazioni, all'immediata sospensione della vendita di latte crudo destinato al consumo diretto. Provvede, altresì, a segnalare al Servizio Veterinario competente entro 24 ore ((ore in caso di positività per inibenti) l'esito delle analisi e la sospensione della vendita del latte crudo per il consumo diretto. Tale vendita potrà riprendere solo allorché un singolo campione (anche analizzato in autocontrollo) evidenzi un valore inferiore al limite indicato.

Per *Streptococcus agalactiae* e Stafilococco coagulasi positivo, al riscontro del superamento del limite deve seguire un immediato intervento del responsabile dell'allevamento per la verifica dello stato sanitario degli animali e del rispetto delle corrette procedure di mungitura e sanificazione degli ambienti e degli impianti e per l'adozione degli interventi correttivi ritenuti necessari. La vendita di latte crudo deve essere sospesa se, a seguito di un ulteriore campionamento effettuato entro 30 giorni dalla comunicazione dell'esito dell'ultima analisi, si evidenzia il permanere del superamento del limite indicato.

Con la Nota 3941 del 3 febbraio 2009, vengono ulteriormente ribadite le norme concernenti il controllo del latte da parte dei Dipartimenti di Prevenzione Veterinari dell'ASL, e le modalità di adozione dei provvedimenti di sospensione della vendita del latte da parte dell'allevatore in caso di superamento dei limiti indicati in tabella.

Inoltre nel caso di superamento del limite per *E.coli*O157, viene inserito un campionamento obbligatorio delle feci delle vacche e l'esclusione dalla produzione di latte destinato alla vendita diretta degli animali positivi.

5. SCOPO DEL PROGETTO

Il progetto ha avuto lo scopo di studiare in dettaglio le fonti di contaminazione batterica del latte durante la prima fase del processo produttivo, quella che si svolge in stalla, analizzando tutti i passaggi, dall'animale fino al tank di mungitura.

In particolare gli obiettivi principali del lavoro sono stati:

- l'identificazione dei punti critici riguardanti la qualità microbiologica del latte;
- la quantificazione dell'importanza relativa delle differenti fonti di contaminazione, anche in funzione della variabilità dei fattori ambientali;
- lo studio delle relazioni tra caratteristiche microbiologiche del latte ed eventuale presenza di patogeni zoonosici nelle feci delle bovine e nel latte;
- la messa a punto di un sistema diagnostico, per l'individuazione rapida e semplice in azienda delle fonti di contaminazione batterica del latte.

6. APPROCCIO METODOLOGICO

Scelta del campione

Il progetto ha seguito 64 aziende produttrici di latte. Di queste, 22 conferenti della Santangiolina Latte Fattorie Lombarde Società Agricola Cooperativa, e distribuite in diverse province del territorio lombardo (Cremona, Lecco, Lodi, Milano, Monza e Brianza e Pavia), mentre le altre 42 appartengono all'area pedemontana delle provincie di Como e Lecco. Definiremo gruppo A le aziende della Santangiolina latte, e gruppo B quelle dell'area di Como e Lecco.

Le aziende del gruppo A sono state scelte tra i 250 soci, che costituivano la cooperativa, in base ad alcuni criteri mirati a creare un campione sufficientemente omogeneo e rappresentativo delle tipologie aziendali più diffuse sul territorio lombardo: tutte le aziende adottavano la stabulazione libera, erano dotate di impianto di mungitura a spina di pesce, mungevano 2 volte al giorno e avevano un numero di bovine adulte inferiore a 200. Nell'ambito degli allevamenti con tali caratteristiche sono stati selezionati due gruppi di aziende, il primo costituito da aziende caratterizzate storicamente da buoni e costanti risultati in termini di qualità microbiologica del latte, il secondo da aziende caratterizzate da situazioni problematiche con elevati valori di carica batterica del latte anche se nei limiti di legge. La selezione è stata condotta sulla base delle analisi effettuate sul latte di massa di ciascuna azienda negli anni 2006-2008, estratte dal database della cooperativa Santangiolina. Dalle medie mensili di tali valori si sono scelte le aziende con la più elevata percentuale di valori mensili di carica superiori a $4,18 + 0,4 \log_{10} \text{ ufc/mL}$, soglia calcolata dalla media della carica batterica dei 3 anni di tutto il campione a cui è stata sommata la rispettiva deviazione standard. Con questo procedimento si è individuato un gruppo di 14 aziende caratterizzate storicamente da problemi di controllo dei livelli di contaminazione batterica del latte (più del 24% di controlli mensili superiori alla soglia). Parallelamente, si è proceduto a scegliere un gruppo di aziende caratterizzate dalle più basse percentuali di valori mensili superiori alla soglia: in questo modo si è individuato un secondo gruppo di 8 aziende caratterizzate storicamente da valori bassi e soprattutto costanti della carica batterica del latte (meno del 6% dei valori dei controlli mensili superiori al limite).

Il gruppo B è costituito da aziende che commercializzano latte crudo e che hanno volontariamente aderito al piano di autocontrollo. Tutte le aziende presentavano

comunque una carica batterica consentita dal Pacchetto Igiene per la vendita di latte crudo.

Raccolta dei dati e dei campioni

Le aziende del gruppo A sono state visitate 3 volte, in corrispondenza della mungitura serale, in tre diverse stagioni. Estate, inverno e stagione intermedia (la primavera e l'autunno).

In occasione di ognuna delle 3 visite aziendali tutte le bovine in mungitura sono state punteggiate utilizzando il sistema dell'*hygiene score*, un metodo di valutazione della pulizia degli animali messo a punto da ricercatori statunitensi (Schreiner e Ruegg, 2002; 2003) che prevede l'assegnazione di un punteggio da 1 a 4 in funzione del grado d'imbrattamento di tre parti anatomiche della bovina: mammella, arti e fianchi.

Le aziende del gruppo B sono state visitate nell'arco di un intero anno, senza suddivisione stagionale e per ciascuna è stata effettuata una sola visita.

Per la ricerca di patogeni zoonosici, durante ogni visita aziendali, sono stati raccolti i seguenti campioni:

- un campione di latte prelevato goccia a goccia durante tutta la mungitura rappresentativo di tutta la mandria;
- due campioni di feci delle bovine in lattazione prelevati in corsia di alimentazione, mediante calpestamento di un'area di 1 metro quadrato, tramite appositi calzari monouso;
- il filtro di mungitura, prelevato al termine della mungitura.

Su tutti i campioni di latte e sul filtro di mungitura è stata effettuata la ricerca dei seguenti patogeni: *Escherichia coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes*, *Yersinia enterocolitica* e *Mycobacterium avium* subsp *paratuberculosis*. Sui campioni fecali è stata inserita la ricerca di *Campylobacter spp. coli*, *Campylobacter spp. jejuni* e *Salmonella enterica*, ed è stata eliminata quella di *Staphylococcus aureus* e *Prototheca spp.* utilizzando le metodiche in uso presso la sezione Malattie Infettive del DIPAV.

7. MATERIALI E METODI

Dopo il prelievo in azienda e l'arrivo in laboratorio, i campioni venivano processati come riportato di seguito, mentre i protocolli delle metodiche biomolecolari sono stati messi a punto nel corso delle fasi preliminari di questo lavoro.

Il latte della mungitura è stato seminato su Agar sangue, per la ricerca dei patogeni contagiosi e su Saboreaux per la ricerca di *Prototheca* spp.. Le piastre sono state incubate a 37°C overnight e lette il giorno successivo. Il Saboreaux è stato incubato a 48h a causa della crescita a volte lenta di *Prototheca*.

Per la ricerca di MAP, *Listeria monocytogenes* e *Yersinia enterocolitica* si centrifugavano 50 ml di latte a 4000 rpm per 20 minuti. Il latte veniva poi eliminato ed il pellet ottenuto veniva lavato due volte con acqua distillata, centrifugando a 4000 per 20 minuti, e veniva quindi risospeso in 10ml di brodo triptosio.

Per la ricerca di *E.coli* O157:H7 il brodo è stato incubato a 37°overnight e seminato il giorno successivo su Mac Conkey sorbitolo e posto in termostato a 37°C per 24 h. Dal Mc Conkey sorbitolo sono state isolate le colonie di colore rosa e poste in brodo per la successiva estrazione del DNA.

Per la ricerca di *Yersinia* il brodo veniva posto in cella a 4°C per tre settimane, per favorire la crescita di questi batteri ed inibire quella degli altri. Al termine delle tre settimane, il brodo si seminava su *Yersinia* Selective Agar, contenente gli appositi supplementi selettivi, e veniva posto in termostato a 37°C. Le colonie con centro rosso e trasparenti marginalmente, venivano isolate e poste in brodo triptosio overnight a 37°C per essere poi estratte il giorno successivo.

Anche per la ricerca di *Listeria monocytogenes* il brodo veniva posto in cella a 4°C per tre settimane, terminate le quali i campioni venivano seminati su Oxoid Chromogenic Listeria Agar a cui erano stati aggiunti i supplementi selettivi appropriati. Le piastre sono state poste in termostato a 37°C per 48 h e le colonie di aspetto tipico sono state isolate e poste in brodo di arricchimento overnight a 37°C. Da qui si procede all'estrazione del DNA il giorno successivo.

Per la ricerca di MAP invece, l'estrazione di DNA veniva effettuata dal pellet ottenuto.

Filtro di mungitura

Il filtro veniva lavato in 250ml di acqua distillata, ed eliminato. Questo materiale veniva quindi processato come descritto per il latte.

Per la ricerca di MAP invece, si procedeva all'estrazione di DNA dal pellet ottenuto, come per il latte.

Campioni di feci

Per la ricerca di *E.coli* O157:H7, di *Yersinia* e *Listeria*, un grammo di feci veniva posto in 10ml di brodo triptosio: i brodi venivano trattati come per il latte e filtro. Per la ricerca di MAP il DNA è stato estratto dal campione fecale, come riportato di seguito. Per la ricerca di *Campylobacter spp. coli e jejuni*, un grammo di feci è stato posto in 50ml di Oxoid Nutrient Broth a cui sono stati aggiunti 5% sangue bovino lisato. I campioni sono stati quindi incubati a 42°C per 48 h in condizioni di microaerofilia.

Successivamente dal brodo si effettuava l'estrazione del DNA, in parallelo con la semina su terreno agar sangue, preparato con sangue di bovino lisato, addizionato di *Campylobacter spp. Selective Medium* in microaerofilia.

Per la ricerca di *Salmonella enterica* è stato effettuato un pre-arricchimento per 24h a 37°C, sospendendo un grammo di feci in 10 ml di acqua peptonata. Successivamente 1 ml di questo brodo è stato posto in 9 ml di brodo selettivo Müller-Kauffmann, addizionato di supplemento e di ioduro di potassio. Dopo un'ulteriore incubazione alle medesime condizioni, è stato seminato su XLT4, adjuvato con XLT4 agar supplement.

Le colonie di Salmonella sono di colore nero.

Estrazione del DNA batterico

Dalle piastre contenenti i diversi terreni selettivi sono state prelevate le colonie con aspetto tipico dei batteri di nostro interesse e coltivate in brodo triptosio per 24 h a 37°C per la successiva estrazione del DNA batterico. Questa viene effettuata mediante il kit d'estrazione Promega, secondo il protocollo fornito dalla ditta.

Una volta estratto, il DNA è stato analizzato mediante PCR specie-specifica nel caso di *Listeria monocytogenes* e *Yersinia enterocolitica* e genere-specifica nel caso di *Campylobacter spp.*.

Per l'estrazione del DNA di MAP da feci, filtro e latte è stato usato un kit commerciale (Adiapure kit, Adiagene France) appositamente progettato per l'estrazione del DNA di MAP. In breve, 1 g di feci è stato diluito in 20 ml di acqua deionizzata sterile, agitato su vortex per 10 secondi e lasciato sedimentare per 40 minuti. 300 µl del surnatante sono stati prelevati, addizionati con 20 µl di Lysis Buffer 2 e incubati 10 minuti a 70°C seguiti da 10 minuti di incubazione a 90°C. Sono stati aggiunti 300 µl di Lysis Buffer 1 e 300 mg di glass beads (Adiapure, Adiagen, France), il campione è stato trattato in un mixer mill (MM301, Retsch, Germania) a 30 Hz per 10 minuti e centrifugato a 7600 g per 5 minuti. Il surnatante è stato ricentrifugato alla medesima velocità e per il medesimo tempo. 300 µl del surnatante sono stati caricati su un filtro a vuoto F1 che trattiene i detriti cellulari più grossi e il filtrato è stato caricato su un secondo filtro a vuoto F2 che ha un'elevata affinità per il DNA. L'applicazione del vuoto ha eliminato il liquido in eccesso trattenendo il DNA, sono stati eseguiti due lavaggi con FW buffer e l'eluizione del DNA in buffer EB. Il DNA così ottenuto è stato conservato a -20°C fino ad essere processato.

PCR

Per la messa a punto e l'ottimizzazione delle diverse PCR sono stati utilizzati i seguenti ceppi di controllo: ATCC o DSMZ

Listeria monocytogenes

Gene target: HlyA (listeriolisina O)

Primers:

LM Fw: CCT AAG ACG CCA ATC GAA

LM Rw: AAG CGC TTG CAA CTG CTC

Amplificato: 702 bp

Protocollo termico: 94°C per 5 minuti. 94°C per 45 secondi, 55°C per 45 secondi, 72°C per 45 secondi, ripetere per 35 volte ed infine 72°C per 8 minuti.

Yersinia enterocolitica

Gene target: ail (attachment-invasion-locus)

Primers

ail Fw: ACT CGA TGA TAA CTG GGG AG

ail Rw: CCC CCA GTA ATC CAT AAA GG

Amplificato: 170 bp

Protocollo termico: 94°C per 5 minuti. 94°C per 30 secondi, 57°C per 30 secondi, 70°C per 1 minuto, ripetere per 35 volte ed infine 72°C per 8 minuti.

E. coli- ricerca dei fattori di patogenicità

Gene target: eae (gene dell'intimina)

Primers

Eae Fw: GGA CCC GGC ACA AGC ATA AG

Eae Rw: GAA ATA GTC TCG CCA GTA TTC

Peso atteso: 875 bp

Geni target: 157 (capsulare); VTX (tossine verocitotossiche)

O157 Fw: GTG TCC ATT TAT ACG GAC ATC CAT G

O157 Rw: CCT ATA ACG TCA TGC CAA TAT TGC C

Peso atteso: 368

VTX1 Fw: TGT AAC TGG AAA GGT GGA GTA TAC

VTX1 Rw: GCT ATT CTG AGT CAA CGA AAA ATA AC

Peso atteso: 210

VTX2 Fw: GTT TTT CTT CGG TAT CCT TAT TCC G

VTX2 Rw: GAT GCA TCT CTG GTC ATT GTA TTA C

Peso atteso: 484

Protocollo termico: 94°C per 2 minuti. 94°C per 30 secondi, 58°C per 45 secondi, 72°C per 1 minuto, ripetere per 35 volte ed infine 72°C per 8 minuti.

Campylobacter spp. coli e jejuni

Gene target: flaA/flaB (flagelline)

Primers PCR:

CF03 Fw: GCT CAA AGT GGT TCT TAT GCA ATG G

CF04 Rw: GCT GCG GAG TTC ATT CTA AGA CC

Peso atteso: 340-380bp

Protocollo termico: 94°C per 4 minuti. 95°C per 5 secondi, 53°C per 30 secondi, 72°C per 40 secondi, ripetere per 35 volte ed infine 72°C per 10 minuti.

Primers seminested PCR:

CF03 Fw: GCT CAA AGT GGT TCT TAT GCA ATG G

CF02 Rw: AAG CAA GAA GTG TTC CAA GTT T

Peso atteso: 180-220bp

Protocollo termico: 94°C per 4 minuti. 95°C per 5 secondi, 53°C per 30 secondi, 72°C per 40 secondi, ripetere per 35 volte ed infine 72°C per 10 minuti.

Real time PCR

Alla fine del 2005 è stata messa a punto, dal dott. Liandris nel laboratorio della sezione una RT-PCR, usando i primers e la sonda riportati da (Khare *et al.*, 2004) che amplificano un segmento della sequenza IS900. La reazione di amplificazione è stata eseguita in un volume finale di 25 µl ed era costituita da 12,5 µl di Dynamo probe qPCR kit (Finnzymes, Finlandia), 10 pmol di Primer 1, 10 pmol di Primer 2, 5 pmol di sonda, 5 µl di DNA e acqua a volume. Le condizioni di amplificazione erano 1 ciclo a 95°C per 15 minuti seguito da 45 cicli a 95°C per 15 sec e 60°C per 1 minuto.

Attualmente nei nostri laboratori è ancora in uso questo protocollo ed è quello utilizzato anche in questo lavoro.

Analisi statistica

I dati ottenuti dalle analisi di laboratorio e dai dati rilevati in campo nel corso del progetto LATTESAN sono stati elaborati statisticamente utilizzando il pacchetto statistico SAS (2001). Tutti i dati delle analisi microbiologiche sono stati sottoposti a trasformazione logaritmica (\log_{10}) prima dell'analisi statistica. Sono state fatte analisi di tipo descrittivo utilizzando le procedure PROC MEANS e PROC FREQ. L'analisi statistica della relazione fra le caratteristiche igieniche dell'azienda ed il rischio di presenza di batteri zoonosici nell'ambiente, latte o filtro, è stata effettuata definendo le appropriate tabelle di contingenza per gli indicatori di rischio e le relative variabili risposta (Rischio per), mediante procedure FREQ del software SAS 9.2 (Sas Institute, Cary NC). Il rapporto di prevalenze e dei relativi limiti di confidenza è stato calcolato mediante software WIN Episcopo 2.0. Le analisi statistiche della frequenza di positività ai patogeni presi in considerazione è stata analizzata mediante Chi quadrato di Pearson

8. RISULTATI

Nell'ambito del progetto sono stati esaminati successivamente due differenti gruppi di aziende lombarde. Il primo (gruppo A) comprendeva allevamenti situati nelle province di Milano, Lodi e Pavia, il secondo invece allevamenti delle province di Como e Lecco.

Gruppo A

Per ciascuna azienda sono stati effettuati tre prelievi, in tre stagioni differenti: l'estate, l'inverno e la stagione intermedia.

Latte e filtro

Pochi sono stati i riscontri di patogeni nel latte e nel filtro in tutti e tre i prelievi effettuati, come evidenziato nelle tabelle che seguono.

Aziend	S.aureu	E.coli	E.coli	Prototh	Prototh	MAP	MAP	Yersini	Yersini	Listeria	Listeria
1											
2	40					Pos.	Pos.				
3											
4			Pos.								
5										L.ivano	
6											
7											
8								Pos.	Pos.		
9											
10	>1000										
11							Pos.				
12	20										
13											
14											
15	800					Pos.					
16											
17											
18											
19											
20											
21											
22				Pos.	Pos.	Pos.					

Tabella 1 Risultati delle analisi dei campioni di latte e filtro del latte nel corso delle indagini della stagione invernale

Azienda	S.aureus	E.coli	E.coli	Prototheca	Prototheca	MAP	MAP	Yersinia	Yersinia	Listeria	Listeria
1					N.E.						
2	>400						Pos.				
3											
4											
5											
6											
7					N.E.						
8											
9											
10											
11							Pos.				
12											
13											
14							Pos.				
15	>500										
16							Pos.				
17											
18	>500										
19											
20				Pos.	Pos.						
21											
22					Pos.		Pos.				

Tabella 2 Risultati delle analisi dei campioni di latte e filtro del latte nel corso delle indagini della stagione intermedia

Azienda	S.aureus	E.coli	E.coli	Prototheca	Prototheca	MAP	MAP	Yersinia	Yersinia	Listeria	Listeria
1											
2	60		Pos.			Pos.					
3			Pos.								
4											
5											
6											
7				Pos.							
8											
9											
10											
11											
12	inquinato										
13											
14	inquinato										
15	inquinato										
16											
17	inquinato						Pos.				
18											
19											
20											
21											

Tabella 3 Risultati delle analisi dei campioni di latte e filtro del latte nel corso delle indagini della stagione estiva

Un totale di 5 aziende su 22, ha mostrato positività per *S.aureus* nel latte, alcune ripetutamente nel corso dello studio ed altre in un singolo campione. Nella stagione invernale in 4 aziende è stata identificata la presenza di *S. aureus*, tuttavia solo in due il batterio è stato riscontrato in cariche superiori ai limiti di legge, mentre nelle altre due aziende la carica era bassa. Nella stagione intermedia, una delle due aziende con carica elevata di *S. aureus* ed una con carica bassa sono risultate negative, mentre nelle altre due è stata riconfermata la presenza del batterio e con una carica superiore ai limiti consentiti dalla legge. Inoltre in un'azienda negativa al prelievo invernale è stata riscontrata un'elevata carica di *S.aureus*, che non è stata però riconfermato nel campionamento successivo. Nella stagione estiva, in un solo allevamento è stato isolato il batterio, lo stesso allevamento in cui entrambi i campioni precedenti erano risultati positivi, inizialmente con valori entro i limiti di legge e poi superiori. L'analisi statistica non ha rilevato differenze significative nella frequenza di positività per *S.aureus* nelle diverse stagioni.

Prototheca spp. è stata riscontrata solo in due aziende: in una di queste, tutti i campioni, sia di latte che il filtro di mungitura sono risultati positivi nel corso dello studio. Nell'altra azienda invece, *Prototheca spp.* è stata identificata solo nella stagione intermedia, sia nel latte che nel filtro. Anche in questo caso non è emersa alcuna correlazione statistica fra la presenza dell'alga e la stagione.

Yersinia enterocolitica è stata riscontrata in una sola azienda a livello di latte e filtro e solo durante il campionamento invernale, ma apparteneva ad un sierotipo non patogeno per l'uomo.

L'unico batterio del genere *Listeria* riscontrato nel corso delle indagini apparteneva alla specie *ivanovii*, che non è considerata patogena per l'uomo.

La positività per STEC è risultata bassa e sporadica: infatti in 4 aziende è stata rilevata la presenza di STEC in un singolo campione di latte o nel filtro del latte. Nella stagione invernale è stata riscontrata una sola positività in un filtro di mungitura, mentre in quella intermedia tutti i campioni esaminati sono risultati negativi. Durante l'estate si è verificato un aumento della presenza di STEC nel latte e/o filtro: in due aziende i batteri sono stati identificati nel filtro di mungitura, in un'altra nel latte.

Infine, per quanto riguarda MAP, la sua presenza è stata riscontrata in 8 aziende nel corso dello studio, a livello di latte, filtro del latte o entrambi i campioni. Solo due di queste però sono risultate positive in almeno 2 dei 3 campionamenti effettuati, mentre in tutti gli altri allevamenti il microrganismo è stato identificato in un solo campione, per lo più nel filtro di mungitura. La maggior presenza di MAP nel latte è stata riscontrata nella stagione invernale, mentre nella stagione intermedia il batterio è stato rilevato solo nel filtro di mungitura. Le differenze non sono risultate però statisticamente significative.

Campioni ambientali

Durante lo studio è stata riscontrata la presenza di *Salmonella* enterica in un solo campione ambientale. Nel medesimo allevamento erano morti 8 vitelli, nelle settimane precedenti al campionamento. L'esame autoptico e batteriologico ha evidenziato come la causa dei decessi fosse una *Salmonella* enterica, identica a quella isolata a livello ambientale. Nei campioni effettuati nel periodo successivo non è stata più riscontrata la presenza del microrganismo.

In nessuno dei tre campionamenti è stato possibile isolare né *Yersinia enterocolitica* né *Listeria monocitogenes*, nemmeno nelle due aziende in cui si era verificato un episodio di positività rispettivamente a *Yersinia enterocolitica* nel latte e filtro e a *L.ivanovii*.

Per quanto riguarda *Campylobacter spp*, solo un campione ha dato esito positivo, ma il batterio isolato non apparteneva né al genere *jejuni*, né al genere *coli*.

Al contrario, le indagini hanno evidenziato un'elevata presenza di *E.coli* verocitotossici nelle feci delle vacche, in tutte le stagioni (tabella 4). A livello ambientale infatti, nella quasi totalità delle aziende (91%) sono stati isolati STEC in almeno un campione di feci nel corso delle 3 stagioni. In particolare, in 10 aziende è stata identificata la presenza del microrganismo nella stagione invernale, ma solo in un caso alle feci positive è corrisposta una positività a livello di latte o filtro. Nella stagione intermedia è stata dimostrata la presenza di STEC in 9 aziende, solo 4 delle quali erano risultate positive al prelievo effettuato in inverno. Infine nella stagione estiva si è verificato il massimo picco di positività, con l'isolamento del microrganismo in 12 aziende. Le quattro aziende che erano risultate positive al latte o al filtro hanno dimostrato positività altalenanti alle feci. A causa del riscontro costante di STEC a livello ambientale, non sono emerse correlazioni significative tra la presenza di questi batteri nelle feci delle vacche e la stagione di campionamento.

La presenza di MAP nell'ambiente è risultata piuttosto elevata, infatti quasi il 60% delle aziende ha avuto almeno un campione positivo nel corso dello studio. Il microrganismo è stato riscontrato più frequentemente nella stagione intermedia, quando in 9 aziende è stata identificata la presenza di MAP nelle feci delle vacche. Al contrario, nel campionamento invernale sono

risultate positive al batterio 4 aziende, e 5 in quello estivo. La figura 1 mostra le positività a STEC e MAP, nelle diverse stagioni. Dall'analisi statistica non sono però emerse differenze significative tra l'identificazione di MAP nell'ambiente e la stagione. Il riscontro di microrganismo nell'ambiente si è dimostrato saltuario, infatti solo in 5 aziende è stato possibile confermarne la presenza in almeno un ulteriore campione. Infine è interessante sottolineare come nella maggior parte dei casi, all'identificazione di MAP nel latte o nel filtro del latte non sia corrisposto un parallelo riscontro del batterio nei campioni ambientali.

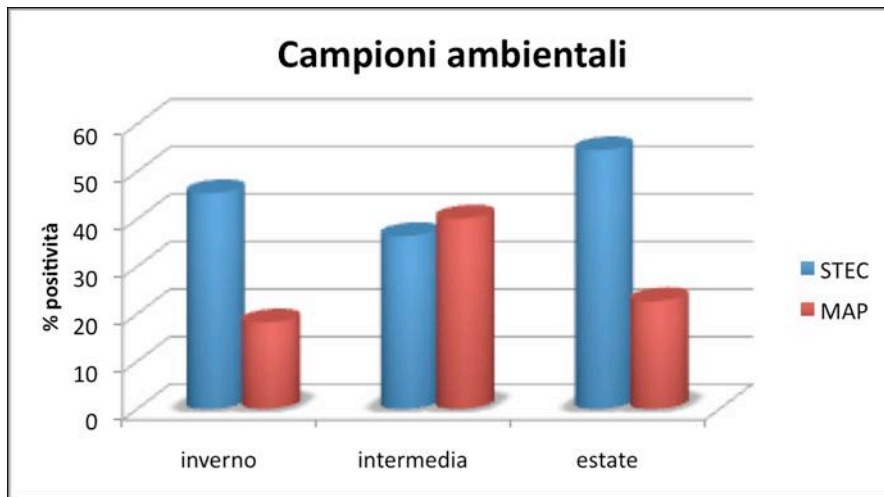


Figura 1 Andamento stagionale della positività a STEC e MAP nei campioni ambientali

Azienda	Stagione invernale		Stagione intermedia		Stagione estiva	
	E.coli	MAP	E.coli	MAP	E.coli	MAP
1						
2					Pos.	
3			Pos.	Pos.		
4	Pos.		Pos.		Pos.	
5	Pos.					Pos.
6	Pos.					
7		Pos.			Pos.	
8					Pos.	
9		Pos.	Pos.	Pos.	Pos.	
10	Pos.		Pos.		Pos.	
11	Pos.	Pos.	Pos.			Pos.
12					Pos.	
13	Pos.			Pos.	Pos.	Pos.
14	Pos.		Pos.	Pos.	Pos.	
15			Pos.			
16				Pos.		
17			Pos.	Pos.		Pos.
18				Pos.	Pos.	
19	Pos.				Pos.	
20	Pos.			Pos.		
21	Pos.	Pos.		Pos.	Pos.	
22						Pos.

Tabella 4 Presenza di *E. Coli* STEC e MAP nei campioni ambientali nel corso delle indagini.

Infine, considerando i parametri di hygiene score rispetto al rischio di presenza dei patogeni zoonosici sul filtro-calza e nel latte, è emerso un rischio statisticamente significativo ($P < 0.05$) per *S.aureus* e STEC in presenza di scarsa igiene degli animali (figura 2).

Indicatore di rischio	Rischio per	Frequenza a rischio	Frequenza non a rischio	Rapporto prevalenza
Fianchi >15% di Score 3-4	<i>S.aureus</i>	16.3%	0	Non stimabile
Fianchi >25% di score 3-4	<i>S.aureus</i>	18.9%	3.45%	5.49
	MAP latte	10.8%	0	Non stimabile
Mammella >5% di score 3-4	STEC	56.6%	30.8%	1.84

Tabella 5 Influenza dei parametri di hygiene score sul rischio di presenza dei patogeni zoonosici nel latte e nel filtro del latte.

Gruppo B

Diversamente dal gruppo A, tutte le aziende del gruppo B attuano la vendita diretta del latte crudo. Inoltre in questi allevamenti è stato effettuato un singolo campionamento, non essendo emerse nel gruppo A, correlazioni significative tra la stagione e la presenza dei patogeni nei campioni esaminati. Le positività per i diversi patogeni, riscontrate nei campioni di latte, nel filtro del latte e nei campioni ambientali sono riassunte nella tabella 5.

Latte e filtro

In una sola azienda su 42 è stato rinvenuto *S.aureus* nel latte di mungitura, con una carica di 20UFC/ml, valore inferiore ai limiti stabiliti dalla normativa regionale per la vendita di latte crudo.

Non sono mai state individuate *Prototheca spp.*, *Yersinia enterocolitica* o *Listeria monocytogenes* in nessuno dei campioni esaminati.

In ben 9 aziende su 42, è stata dimostrata la presenza di STEC nel filtro di mungitura; 4 di queste sono risultate positive anche nel latte.

MAP è stato riscontrato con una frequenza molto bassa, infatti solamente in un'azienda è stato identificato nel latte e in tre nel filtro del latte. Tuttavia nell'unica azienda con il latte positivo il filtro è risultato negativo.

Campioni ambientali

Nessun *Campylobacter spp.* è mai stato isolato nel corso di questa indagine, in nessuna delle 42 aziende.

Allo stesso modo non è mai stato possibile isolare *Salmonella enterica*, *Yersinia enterocolitica* o *Listeria monocytogenes*.

I campioni ambientali positivi a STEC sono risultati 9, pertanto nel 21.4% delle aziende è presente il batterio a livello fecale. Tuttavia solo in un allevamento, alla positività ambientale si è accompagnato l'isolamento del microrganismo nel latte e in 2 nel filtro del latte.

Infine, in solo 5 aziende è stato possibile dimostrare la presenza di MAP in uno dei campioni esaminati. Più precisamente, solo un allevamento è risultato positivo nel latte, e 3 nel filtro di mungitura.

AZIENDA	S.aureus	STEC lat	STEC fil	STEC amb.	MAP latte	MAP fil	MAP amb.
1							
2				+			
3							
4							
5							
6						+	+
7	20 UFC/ml					+	
8			+	+			+
9							
10							
11				+			+
12							
13							
14				+			
15							
16							
17				+			
18				+			
19			+				
20		+	+				
21		+	+				
22			+	+			
23							
24						+	
25							
26							
27							
28							
29							
30							
31				+			
32							
33							
34							
35					+		
36							
37							
38		+	+				
39		+					
40		+					
41							
42		+		+			

Tabella 6: presenza di microrganismi zoonosici nei campioni delle aziende appartenenti al gruppo B

L'apparente differenza fra le aziende del gruppo A e quelle del gruppo B nella prevalenza dei patogeni a livello di latte, filtro del latte e campioni ambientali, è stata analizzata mediante il test χ^2 di Pearson. Poiché gli allevamenti del gruppo B sono stati campionati una sola volta, i dati ottenuti nelle diverse stagioni sono stati messi in relazione con quelli dell'altro gruppo, nell'ambito della stagione corrispondente. L'analisi statistica ha evidenziato differenze significative tra le due aree solamente nella stagione intermedia per la presenza di STEC nel latte. Infatti le aziende dell'area lariana hanno mostrato una maggior positività rispetto a quelle dell'area milano-pavese, con un valore di $P < 0.043$.

9. DISCUSSIONE

Il progetto ha avuto lo scopo di studiare le fonti di contaminazione batterica del latte durante la prima fase del processo produttivo, quella che si svolge in allevamento, analizzando tutti i passaggi, dall'animale fino al tank di mungitura.

Il progetto è stato realizzato in due fasi successive e in due gruppi di aziende situati in aree geografiche differenti. Il primo gruppo (gruppo A) localizzato in aree di pianura di diverse province della Lombardia (Cremona, Lodi, Milano, Monza e Brianza, Pavia), costituiva un campione sufficientemente omogeneo e rappresentativo delle tipologie aziendali più diffuse sul territorio lombardo: tutte le aziende adottavano la stabulazione libera, erano dotate di impianto di mungitura a spina di pesce, mungevano 2 volte al giorno e avevano un numero di bovine adulte inferiore a 200. In questo gruppo sono stati effettuati tre prelievi in tre stagioni differenti. Il secondo gruppo (gruppo B) era costituito da aziende del comprensorio di Como e Lecco, caratterizzate dalla stessa tipologia di allevamento, ma che attuano la vendita diretta del latte. Tutti questi allevamenti sono stati oggetto di un solo prelievo.

Le indagini effettuate nel gruppo A hanno evidenziato in generale un buon livello di igiene di stalla. Questo dato emerge dal basso numero di positività ai batteri zoonosici oggetto dello studio: in particolare era minimo il numero di patogeni presenti nel latte di mungitura. È interessante sottolineare come, durante tutto il periodo di indagine, le aziende con un livello igienico più elevato abbiano sempre conferito latte ad alta qualità, mentre quelle con un livello inferiore abbiano conferito latte alimentare. Il basso livello di patogeni presente nel latte è indice di un buon livello di attenzione e di igiene durante le operazioni di mungitura.

Al contrario, nel gruppo B tutte le aziende sono soggette ad autocontrollo, commercializzando latte crudo. In questi allevamenti però la frequenza di positività del latte di mungitura ad alcuni batteri zoonosici, in particolare *E.coli* verocitotossici, è risultata significativamente più elevata rispetto a quelle del gruppo A.

In generale, *S. aureus* è stato riscontrato in cariche superiori ai limiti di legge in tre aziende del gruppo A, mentre nel gruppo B una sola stalla su 42 ha dimostrato positività, ma con una carica ben al di sotto della soglia stabilita dalla normativa regionale per la vendita diretta del latte crudo. I dati sono comunque confortanti, tenendo conto del fatto che il microrganismo in questione è comunemente

presente sulla cute della mammella ed è il più frequente agente eziologico di mastiti bovine. La scarsa presenza di *S. aureus* indica una mammella generalmente sana, con capezzoli integri che impediscono l'ingresso del patogeno, nonché un' corretta pulizia e disinfezione dei capezzoli pre- e post-mungitura.

Anche la bassa frequenza di positività a *Prototheca spp.* sia nel latte che nel filtro di mungitura, rappresenta un dato rassicurante. Infatti questa microalga è un importante patogeno della vacca, determinando l'insorgenza di gravi mastiti, difficilmente trattabili, che spesso comportano l'eliminazione dell'animale per l'impossibilità di recupero funzionale della mammella. Va sottolineato che la mastite non solo è un problema sanitario per la bovina, ma è anche in grado di influenzare negativamente la qualità igienica del latte e quindi l'efficienza economica degli allevamenti. In passato sono stati osservati sporadici casi di mastite da *Prototheca spp.*, mentre oggi viene identificata come malattia endemica diffusa in tutto il mondo. Il rischio d'insorgenza d'infezione è strettamente correlato con la presenza in allevamento di fattori predisponenti, quali una scarsa igiene ambientale ed un'insufficiente igiene della mungitura. Di conseguenza, il raro riscontro di tale patogeno in aziende rappresenta un indicatore di un buon livello di igiene dell'allevamento.

La quasi totale assenza di *Salmonella enterica* è indice di un buon livello sanitario: l'unico caso di isolamento del patogeno nel corso delle indagini, è stato riscontrato in un'azienda dove nella vitellaia si sono verificati 8 decessi per infezioni da *Salmonella enterica*.

L'isolamento di una sola *Yersinia enterocolitica* in entrambi i gruppi, che peraltro si è dimostrata priva del gene *ail* e conseguentemente non patogena per l'uomo, conferma che si tratta di un problema di scarsa rilevanza, negli allevamenti bovini del nostro territorio. Questo dato conferma i risultati di Eisen et al. (2008) che hanno segnalato come il batterio venga trasmesso principalmente dai suini ed il rischio di tossinfezione sia legato al consumo di carne di maiale e non di latte. Non si possono tuttavia ignorare le segnalazioni di tossinfezioni legate al consumo di prodotti a base di latte (Kapperud, 1991), che rendono opportuno un continuo controllo della reale presenza di questo batterio nell'alimento, nonostante i risultati confortanti.

La totale assenza di *Listeria monocytogenes* sia negli allevamenti del gruppo A che in quelli del gruppo B, in feci, latte e filtro conferma che la contaminazione avviene maggiormente nei processi di lavorazione (Brugère-Picoux et al., 2008; Czuprynsky et al., 2004).

Una dato apparentemente confortante, è la totale assenza di *C. coli* e *C. jejuni*, nelle aziende sia del gruppo A che del gruppo B. Infatti questi batteri colonizzano il tratto intestinale degli animali domestici, senza causare sintomatologia clinica: la loro eliminazione fecale è pertanto normale. La trasmissione bovino-uomo è dovuta al contatto diretto, al consumo di latte e carne. *C.jejuni* rappresenta la principale causa di campilobatteriosi nei paesi in cui si consuma latte crudo. La letteratura riporta che la presenza di *Campylobacter* nel latte sia molto spesso legata alla contaminazione fecale durante la mungitura (de Boer et al., 1984; Oliver et al., 2005). Un numero ridotto di pubblicazioni suggerisce che l'infezione mammaria causi l'eliminazione del batterio nel latte in maniera saltuaria (Hutchinson et al., 1985; Orr et al., 1995).

Tuttavia non possiamo non tener conto del fatto che l'isolamento di questi batteri non è semplice: essi sono labili nell'ambiente e spesso presenti in cariche molto basse nelle deiezioni. Inoltre anche nei soggetti colpiti da enterite dopo il consumo di latte crudo, in cui è stato diagnosticato *Campylobacter*, è quasi sempre impossibile isolare il batterio dal latte o dal filtro di mungitura dell'azienda in causa. Per questo motivo, è stata indagata la presenza del microrganismo nelle deiezioni delle vacche in lattazione e, solo nel caso di positività, si sarebbe proceduto all'analisi del latte e del filtro di mungitura. Tuttavia il fatto che non sia mai stata identificata la presenza di *Campylobacter spp.* in 64 aziende, suggerisce che i campioni non fossero adeguati, soprattutto per il tempo intercorso fra la loro raccolta e l'analisi in laboratorio.

Le indagini hanno confermato un'elevata presenza di *E.coli* verocitotossici nelle feci degli animali, sia nella stagione fredda che in quella estiva, in accordo con quanto riportato in letteratura (Thevenot et al., 2005; Kapperud 1991; Besser et al., 2005; Devane et al., 2005). Nelle aziende del gruppo A erano positivi 31 campioni ambientali su un totale di 66 analizzati, nelle aziende del gruppo B 8 campioni su 42. Questo dato non inaspettato e non è indice di scarsa sanità della mandria, essendo i bovini *carrier* asintomatici. Il gruppo A però mostra una bassissima frequenza di STEC a livello di latte e di filtro del latte, mentre nelle aziende del

gruppo B il numero delle positività del filtro e del latte aumenta significativamente: 5 campioni di latte e 6 filtri positivi. Il dato è sicuramente preoccupante, considerato che tutte queste aziende vendono latte crudo. È possibile dunque affermare che la presenza di batteri a livello ambientale, non rappresenta un problema se le operazioni di mungitura sono svolte con una routine corretta. Questi risultati sottolineano inoltre l'importanza di un controllo continuo nei confronti delle aziende che vendono latte crudo, considerato che le positività emerse nel corso del campionamento sono state confermate in fase di autocontrollo.

Infine per quanto riguarda il MAP, nel caso delle aziende del gruppo A abbiamo riscontrato un discreto numero di positività nelle feci, mentre abbiamo trovato solo 4 positività al latte e 7 al filtro su un totale di 64 campioni analizzati. Nel gruppo B invece sono state riscontrate solamente 3 le positività fecali, 3 a livello del filtro e solo una del latte, ma le differenze non sono statisticamente significative. Gli andamenti delle positività non sono costanti e non sempre è presente una positività contemporanea a latte, filtro e feci nella medesima stalla. Per spiegare questi dati altalenanti, vanno tenuti in considerazione una serie di fattori: 1) la metodica di campionamento, per cui il campione raccolto può non essere rappresentativo; 2) l'eliminazione saltuaria del microrganismo nelle fasi non conclamate della patologia; 3) la carica batterica anche bassa, nelle fasi non conclamate della malattia. Infatti gli animali infetti possono eliminare il batterio in modo saltuario sia nelle feci che nel latte per anni, prima di manifestare la forma clinica. Tale eliminazione può non solo essere saltuaria, ma la carica può anche essere molto bassa. Di conseguenza, la probabilità di avere dei risultati falsi negativi è alta.

Significativo però è il dato che nelle stalle del gruppo B, nella maggior parte delle quali viene applicato il piano di controllo per la paratubercolosi messo a punto nella nostra sezione, le positività siano significativamente più basse rispetto all'altro gruppo in cui il piano non è applicato. Lo schema del piano è riportato per esteso nell'Appendice di questo lavoro. In breve, esso prevede uno screening anticorpale mediante ELISA sul sangue delle vacche all'inizio dell'asciutta. In base ai risultati, viene somministrato ai vitelli solo il colostro degli animali sicuramente negativi, per evitare il rischio di contagio della categoria di animali più a rischio. In

questo modo si costituisce man mano una rimonta sana, che nell'arco di qualche anno rappresenterà l'intera mandria in produzione.

E' importante sottolineare come la presenza di MAP sia stata dimostrata nel 40% delle aziende del gruppo A, una parte delle quali consegna latte contenente il micobatterio. Tenuto conto della bassa percentuale di positività nelle aziende che effettuano il piano di controllo, sembra opportuno suggerire anche alle aziende che non effettuano la commercializzazione diretta del latte crudo, di intraprendere un percorso di sorveglianza. Infatti il MAP non viene ucciso dalla pastorizzazione e pertanto la sua presenza nel latte può rappresentare un rischio per il consumatore, qualora fosse dimostrato il suo ruolo nel morbo di Crohn.

Considerato che i punti critici per la contaminazione del latte si concentrano nel momento della mungitura, si ritiene opportuno e necessario un controllo da parte dell'allevatore dell'igiene delle operazioni di mungitura. Infatti se la presenza nel latte dei batteri responsabili di infezioni mammarie, quali *S.aureus* e MAP, è controllabile mediante opportuni piani di controllo, però la contaminazione fecale del latte si controlla solo mediante una buona routine di mungitura. I risultati dello studio indicano la necessità di effettuare più di un prelievo per stalla, considerata la positività altalenante soprattutto a STEC e MAP, che rende un solo campionamento insufficiente per una visione corretta della situazione aziendale. In questo modo si potrebbe ottenere un monitoraggio continuo della presenza di questi patogeni e della reale efficacia delle misure igieniche durante le operazioni di mungitura.

10. CONCLUSIONI

Dai risultati ottenuti nel corso di questo studio si può affermare che il campionamento ambientale costituisce una buona metodica per individuare il potenziale rischio zoonosico della mandria. È importante però ripetere tale campionamento almeno 3 volte nel corso dell'anno, in quanto si tratta di microrganismi generalmente eliminati in modo saltuario dalle vacche. Anche l'analisi del filtro del latte si è dimostrata molto utile per indagare il grado di affidabilità delle procedure di mungitura. A differenza del latte di tank infatti, dove i microrganismi eventualmente presenti risultano molto diluiti, in questo caso la calza, fermando lo sporco grossolano, aumenta la possibilità di individuare i batteri presenti nel latte. Infine i dati dello studio mostrano che i microrganismi zoonosici, seppur presenti in ambiente, costituiscono solo saltuariamente un reale rischio per il latte, se gli animali vengono munti seguendo pratiche corrette.

BIBLIOGRAFIA

- Aho, A. D., McNulty, A. M. and Coussens, P. M. (2003). Enhanced expression of interleukin-1 and TRAF1 in ileal tissues of cattle infected with *Mycobacterium paratuberculosis*. *Infection and Immunity*, 71: 6479-6486.
- Aidar-Ugrinovich L, Blanco J, Blanco M, Blanco JE, Leomil L, Dahbi G, Mora A, Onuma DL, Silveira WD, Pestana de Castro AF., 2007. Serotypes, virulence genes, and intimin types of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) and enteropathogenic *E. coli* (EPEC) isolated from calves in São Paulo, Brazil. *Int J Food Microbiol.* 115(3):297-306.
- Alexander KA, Warnick LD, Wiedmann M. 2009. Antimicrobial resistant *Salmonella* in dairy cattle in the United States. *Vet Res Commun.* 33(3):191-209
- Ayele, P. S., Svastova, P., Roubal, P., Bartos, M. and Pavlik, I. (2005). *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* cultured from locally and commercially pasteurized cow's milk in the Czech Republic. *Applied and Environmental Microbiology*, 71: 1210-1214.
- Baines, D., Erb, S., and McAllister, T. 2008c. Stx2 from enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 promotes colonization in the intestine of cattle. *Can. J. Anim. Sci.* In press. 88:581
- Bakker, D., Willemsen, P. T. J. and van Zijderveld, F. G. (2000). Paratuberculosis recognized as a problem at last: a review. *Veterinary Quarterly*, 22: 200-204.
- Behr, M. A., Semret, M., Poon, A. and Schurr, E. (2004). Crohn's disease, mycobacteria and NOD2. *Lancet Infectious Diseases*, 4: 136-137.
- Bernstein, C. N., Blanchard, J. F., Rawsthorne, P. and Collins, M. T. (2004). Population-based case control study of seroprevalence of *Mycobacterium paratuberculosis* in patients with Crohn's disease and ulcerative colitis. *Journal of Clinical Microbiology*, 42: 1129-1135.
- Blanco M, Schumacher S, Tasara T, Zweifel C, Blanco JE, Dahbi G, Blanco J, Stephan R. 2005. Serotypes, intimin variants and other virulence factors of eae positive *Escherichia coli* strains isolated from healthy cattle in Switzerland. Identification of a new intimin variant gene (eae-eta2). *BMC Microbiol.* 9:5:23.
- Boelaert, F., Walravens, K. and Biront, P. (1999). Prevalence of paratuberculosis (Johne's disease) in the Belgian cattle population. In: 6th international Colloquium on Paratuberculosis. Manning E. J. M. and Collins, m. T. eds. Melbourne 14-18 February. pp. 76-78.
- Boudeau J, Glasser AL, Masseret E, et al. Invasive ability of an *Escherichia coli* strain isolated from the ileal mucosa of a patient with Crohn's disease. *Infect Immun* (1999); 67: 4499-4509.
- Boudeau J, Glasser AL, Masseret E, et al. Invasive ability of an *Escherichia coli* strain isolated from the ileal mucosa of a patient with Crohn's disease. *Infect Immun* (1999); 67: 4499-4509.
- Bull, T. J., McMinn, E. J., Sidi-Boumedine, K., Skull, A., Durkin, D., Neild, P., Rhodes, G., Pickup, R. and Hermon-Taylor, J. (2003a). Detection and verification of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in fresh ileocolonic mucosal biopsy specimens from individuals with and without Crohn's disease. *Journal of Clinical Microbiology*, 41: 2915-2923.
- Butzler J.P., 2004. "*Campylobacter*, from obscurity to celebrity". *Clinical microbiology and infection*, vol n. 10, pag: 868-876.
- Caprioli A, Morabito S, Brugère H, Oswald E. Enterohaemorrhagic *Escherichia coli*: emerging issues on virulence and modes of transmission. *Veterinary research* 2005;36(3):289-311
- Chacon, O., Bermudez, L. E. and Barletta, R. (2004). Johne's disease, inflammatory bowel disease and *Mycobacterium paratuberculosis*. *Annual Review of Microbiology*, 58: 329-363.
- Chen J., Luo X., Jiang L., Jin P., Wie W., Liu D., Fang W., 2009. "Molecular characteristics and virulence potential of *Listeria monocytogenes* isolates from Chinese food systems". *Food microbiology* vol. n. 26, pag. 103-104.

Chiodini, R. J. (1996). Immunology: resistance to paratuberculosis. *Veterinary Clinics of North America. Food Animal Practice*, 12: 313-343.

Chiodini, R. J. (2003). Twenty years later: where does it all stand? In: Atti della conferenza internazionale di "morbo di Crohn nell'uomo e paratubercolosi nei ruminanti". Istituto zooprofilattico sperimentale delle regioni Lazio e Toscana. Roma, pp13-16.

Chiodini, R. J. and Davis, W. C. (1993). The cellular immunology of bovine paratuberculosis: immunity may be regulated by CD4+ helper and CD8+ immunoregulatory T lymphocytes which down-regulate gamma/ delta T-cell cytotoxicity. *Microbial Pathogenesis*, 14: 355-367.

Chiodini, R. J. and Hermon-Taylor, J. (1993). The thermal resistance of *Mycobacterium paratuberculosis* in raw milk under conditions simulating pasteurization. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 5: 629-131.

Chiodini, R. J. and Rossiter, C. A. (1996). Paratuberculosis: a potential zoonosis? *Veterinary Clinics of North America. Food Animal Practice*, 12: 457-467.

Circolare 19/SAN del 28 giugno 2007.

Clark, D. L., Anderson, J. L., Kozickowski, J. J. and Ellingson, J. I. E. (2006). Detection of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* genetic components in retail cheese curds purchased in Wisconsin and Minnesota by PCR. *Molecular and Cellular Probes*, 20: 197-202.

Clarke, C. J. (1997). The pathology and pathogenesis of paratuberculosis in ruminants and other species. *Journal of Comparative Pathology*, 116: 217-261.

Cliver, D.O., Riehman, M., 2002. Foodborne diseases, 2nd Edition. AP, San Diego Ca (USA)

Cocito, E., Gilot, P., Coene, M., DeKesel, M., Poupart, P. and Vannuffel, P. (1994). Paratuberculosis. *Clinical Microbiology reviews*, 7: 328-345.

Colles F.M., Joens L.A., K., Harding R.M., Maiden M.C.J., 2003. "Genetic diversity of *Campylobacter jejuni* isolates from farm animals and the farm environment". *Applied and environmental microbiology*, vol. n. 69, pag: 7409.

Collins, M. T. (1997). *Mycobacterium paratuberculosis* a potential food borne pathogen? *Journal of Dairy Science*, 80: 3445-3448.

Collins, M. T., Spaihr, U. and Murphy, P. M. (2001). Ecological characteristics of *Mycobacterium paratuberculosis*. *Bulletin of the International Dairy Federation*, 362: 32-40.

Coussens, P. M. (2004). Model for immune responses to *Mycobacterium avium* subsp *paratuberculosis* in cattle. *Infection and Immunity*, 72: 3089-3096.

cow causing cases of human enteritis. *Epidemiology and Infection* 114, 15–24.

Crepaldi G., Baritussio. 2002 Trattato di medicina interna; 274-284.

Czuprynski C., 2004. "Listeria". Pathogenesis of bacterial infections in animals. Blackwell publishing. Pag: 99-106.

dairy farm environment: food safety and public health implications. Foodborne Darfeuille-Michaud A, Neut C, Barnich N, et al. Presence of adherent Escherichia Coli strain in ileal mucosa of patients with Crohn's disease. *Gastroenterology* (1998); 115:1405-1413.

De Boer, E., Hartog, B.J., Borst, G.H.A., 1984. Milk as a source of *Campylobacter jejuni*.

Devane ML, Nicol C, Ball A, Klens JD, Scholes P, Hudson JA, Baker MG, Gilpin BJ, Garrett N, Savill MG, 2005. The occurrence of *Campylobacter* subtypes in environmental reservoirs and potential transmission routes. *J Appl Microbiol* 98:980-990.

Dingle K., Colles F.M., Ure R., Wagenaar J.A., Duim B., Bolton F.J., Fox A.J., Wareing D.R.A., Maiden, 2002. "Molecular characterization of *Campylobacter jejuni* clones: a basis for epidemiologic investigation". *Emerging infections disease*, vol. n. 8, pag: 949.

- Donaghy, J. A., Totton, N. L. and Rowe, M. T. (2004). Persistence of *Mycobacterium paratuberculosis* during manufacture and ripening of cheddar cheese. *Applied and Environmental Microbiology*, 70: 4899-4905.
- Eisen R.J., Vetter S.M., Holmes J.L., Bearden S.W., Monteneri J.A., Gage K.L., 2008. *Source of host blood affects prevalence of infection and bacterial loads of Yersinia pestis in fleas*. *Journal of Medical Entomology* 45, 933-938
- Elli-Iversen J., Pritchard G.C., Wooldridge M., Nielsen M., 2009. "Risk factors for *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* in young cattle on English and Welsh farms". *Preventive veterinary medicine*, vol. n. 88, pag: 42-43.
- Ellingson, J., Anderson, J. L., Kozixzkowski, J. J., Radcliff, R. P., Sloan, S. J., Aðen, S. E. and Sullivan, N. M. (2005). Detection of viable *Mycobacterium avium* subsp *paratuberculosis* in retail pasteurized whole milk by two culture methods and PCR. *Journal of food protection*, 68: 966-972.
- El-Zaatari, F. A., Naser, S. A., Hulten, K., Burch, P. and Graham, D. Y. (1999). Characterization of *Mycobacterium paratuberculosis* p36 antigen and its seroreactivities in Crohn's disease. *Current Microbiology*, 39: 115–119.
- Food Safety Authority of Ireland (1998). http://www.fsai.ie/press_releases/110898.htm. (12/09/2002)
- Gao H., Lei Z., Jia J., Wang S., Chen Y., Sun M., Liang C., 2009. *Application of loop-mediated isothermal amplification for detection of Yersinia enterocolitica in pork meat*. *Journal of microbiological methods* 77, 198-201
- Gasteiner, J., Wenzl, H., Fuchs, K., Jark, U. and Baumgartner, W. (1999). Serological cross sectional study of paratuberculosis in cattle in Austria. *Journal of Veterinary Medicine B*, 46: 457-466.
- Grant, I. R., Ball, H. J. and Rowe, M. T. (1998). Effect of high temperature short time (HTST) pasteurization on milk containing low numbers of *Mycobacterium paratuberculosis*. *Letters in Applied Microbiology*, 26: 166-170.
- Grant, I. R., Ball, H. J. and Rowe, M. T. (2002a). Incidence of *Mycobacterium paratuberculosis* in bulk raw and commercially pasteurized cow's milk from approved dairy processing establishments in the United Kingdom. *Applied and Environmental Microbiology*, 68: 2428-2435.
- Grant, I. R., Ball, H. J., Neill, S. D. and Rowe, M. T. (1996). Inactivation of *Mycobacterium paratuberculosis* in cow's milk at pasteurization temperatures. *Applied and Environmental Microbiology*, 62: 166-170.
- Greenstein, R. J. (2003). Is Crohn's disease caused by a Mycobacterium? Comparisons with leprosy, tuberculosis, and Johne's disease. *Lancet Infectious Diseases*, 3: 507-514.
- Gyles C.L. Fairbrother J.M., 2004. "Escherichia coli in Pathogenesis of bacterial infections in animals". Blackwell publishing. Pag 193, 202-204, 213.
- Gyles C.L., Prescott J.F., Songer J.G., Thoen C.O., 2004. *Yersinia* in "Pathogenesis of bacterial infections in animals" Blackwell publishing 295-305
- Hampe, J., Cuthbert, A., Croucher, P. J. P., Mirza, M. M., Mascheretti, S., Fisher, S., Frenzel, H., King, K., Hasselmeyer, A., MacPherson, A. J., Bridger, S., van Deventer, S., Forbes, A., Nikolaus, S., Lennard-Jones, J. E., Foelsch, U. R., Krawczak, M., Lewis, C. and Schreiber, S. (2001). Association between insertion mutation in NOD2 gene and Crohn's disease in German and British populations. *Lancet*, 357: 1925-1928.
- Hermans K., Devriese L.A., Haesebrouck F., 2004. "*Staphylococcus*" in "Pathogenesis of bacterial infections in animals". Pag: 43-51.
- Hermon-Taylor, J., Barnes, N., Clarke, C., Finlayson, C. (1998). *Mycobacterium paratuberculosis* cervical lymphadenitis followed five years later by terminal ileitis similar to Crohn's disease. *British Medical Journal*, 316: 449-453.
- Hirsh D.C, Maclachan N.J., Walker R.L. *Veterinary microbiology* (2004), Ed Blackwell, 134-138.

- Hudson J.A., Nicol C., Wright J., Whyte R., Hasell S.K., 1999. "Seasonal variation of *Campylobacter* types from human cases, veterinary cases, raw chicken, milk and water". *Journal of applied microbiology*, vol. n. 87, pag: 166.
- Hugot, J. P., Chamaillard, M., Zouali, H., Lesage, S., Cezard, J. P., Belaiche, J., Almer, S., Tysk, C., O'Morain, C. A., Gassull, M., Binder, V., Finkel, Y., Cortot, A., Modigliani, R., Laurent-Puig, P., Gower-Rousseau, C., Macry, J., Colombel, J. F., Sahbatou, M. and Thomas, G. (2001). Association of *NOD2* leucine-rich repeat variants with susceptibility to Crohn's disease. *Nature*, 411: 599-603.
- Hulten, K., El-Zimaity, H. M. T., Karttunen, T. J., Almashhrawi, A., Schwartz, M. R., Graham, D. Y. and El-Zaatari, F. A. K. (2001). Detection of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* in Crohn's diseased tissues by in situ hybridization. *American Journal of Gastroenterology*, 96: 1529-1535.
- Huseby M., Shi K., Brown K., Digre J., Mengistu F., Seo K. S., Bohach G.A., Schlievert P.M., Ohlendorf D.H., Earharti C.A., 2007. "Structure and biological activities of Beta toxin from *Staphylococcus aureus*". *Journal of Bacteriology*, vol. n.189, pag: 8719-8720.
- Hutchinson, D.N., Bolton, F.J., Hinchliffe, P.M., Dawkins, H.C., Horsley, S.D., Jessop, E.G., Ikonomopoulos, J., Pavlik, I., Bartos, M., Svastova, P., Ayele, Y., Roubal, P., Lukas, J., Cook, N. and Gazouli, M. (2005). Detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in Retail Cheeses from Greece and the Czech Republic. *Applied and Environmental Microbiology*, 71: 8934-8936.
- Inohara, N., Ogura, Y., Fontalba, A., Gutierrez, O., Pons, F., Crespo, J., Fukase, K., Inamura, S., Kusumoto, S., Hashimoto, M., Foster, S. J., Moran, A. P., Fernandez-Luna, J. L. and Nunez, G. (2003). Host recognition of bacterial muramyl dipeptide mediated through NOD2. *Journal of Biological Chemistry*, 278: 5509-5512.
- ISTAT, 2005.
- J. T. LeJeune, T. E. Besser, D. H. Rice, J. L. Berg, R. P. Stilborn, and D. D. Hancock, 2004. *Longitudinal Study of Fecal Shedding of Escherichia coli O157:H7 in Feedlot Cattle: Predominance and Persistence of Specific Clonal Types despite Massive Cattle Population Turnover. Appl. Environ. Microbiol* 70: 377-384.
- jejuni as the cause of milk-borne campylobacter outbreak. *Journal of Hygiene* 94,
- Joens L.A., 2004. "*Campylobacter* and *Helicobacter*" in Pathogenesis of bacterial infections in animals. Blackwell publishing. Pag: 353-357.
- Kapperud, 1991. "*Yersinia enterocolitica* in food hygiene". *Int. J. Food Microbiol.* 12: 53-66
- Kasper S., Huhulescu S., Auer B., Heller I., Karner F., Wurzner R., Wagner M., Allerberger F., 2009. Epidemiology of listeriosis in Austria". *Wiener klinische Wochenschrift* vol. n. 121, pag: 113-114.
- Kelly P.T., O'Sullivan K., Berry D.P., More S.J., Meaney W.J., O'Callaghan E.J., O'Brien B., 2009. Farm management factors associated with bulk tank total bacterial count in Irish dairy herds during 2006/2007. *Irish Veterinary Journal*, 62: 36-42.
- Kennedy, D. J. and Benedictus, G. (2001). Control of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* infection in agricultural species. *Revue Scientifique et Technique. OIE*, 20: 151-179.
- Khare, S. T., Ficht, A., Santos, R. L., Romano, J., Ficht, A. R., Zhang, S., Grant, I. R., Libal, M., Hunter, D. and Adams, L. G. (2004). Rapid and sensitive detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in bovine milk and feces by a combination of immunomagnetic bead separation-conventional PCR and real-time PCR. *Journal of Clinical Microbiology*, 42: 1075-1081.
- Klijin, N., Herrewegh, A. P. M. and de Jong, P. (2001). Heat inactivation data for *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*: implications for interpretation. *Journal of Applied Microbiology*, 91: 697-704.
- Krauss H., Weber A., Appel M., Enders B., Isenberg H.D., Schiefer H.D., Slenczka W., von Graevenitz A., Zahner H., 2003. Zoonoses, 3rd Edition. ASM Press, Washington, DC (USA)

- Lappin E., Ferguson A.J., 2009. "Gram-positive toxic shock syndromes". *Lancet infectious disease*, vol. n. 9, pag: 251-283.
- Larsen, A. B., Merkal, R. S. and Vardaman, T. H. (1956). Survival time of *Mycobacterium paratuberculosis*. *American Journal of Veterinary Research*, July: 549-551.
- Lederman E, Neut C, Desreumaux P. et al., Bacterial overgrowth I the neoterminal ileum after ileolic resection for Crohn's disease. *Gastroenterology* (1997); 112: A1023.
- Lee, H., Stabel, J. R. and Kehrl, M. R. (2001). Cytokine gene expression in ileal tissues of cattle infected with *Mycobacterium paratuberculosis*. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 82: 73-85.
- Lesage, S., Zouali, H., Czard, J. P., Belaiche, J., Almer, S., Tysk, C., O'Morain, C. A., Gassull, M., Binder, V., Finkel, Y., Modigliani, R., Gower-Rousseau, C., Macry, J., Merlin, F., Chamailard, M., Jannot, A. S., Thomas, G. and Hugot, J. P. (2002). CARD15/NOD2 mutational analysis and phenotype-genotype correlation in 612 patients with inflammatory bowel disease. *American Journal of Human Genetics*, 70: 845-857.
- Linton M., Mackle A.B., Upadhyay V.K., Kelly A.L., Patterson M.F., 2008. "The fate of *Listeria monocytogenes* during the manufacture of Camembert-type cheese: a comparison between raw milk and milk treated with high hydrostatic pressure". *Innovative food science and emergency technologies* vol. n. 9, pag: 423-424.
- Lovell, R., Levi, M. and Francis, J. (1944). Studies on the survival of Johne's bacilli. *Journal of Comparative Pathology*, 54: 120-129.
- Lund, M. L., Gould, W. G. and Rampling, A. M. (2002). Pasteurization of milk and the heat resistance of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*: a critical review of the data. *International Journal of Food Microbiology*, 77: 135-145.
- Mahajan A, Currie CG, Mackie S, Tree J, McAteer S, McKendrick I, McNeilly TN, Roe A, La Ragione RM, Woodward MJ, Gally DL, Smith DG., 2008 An investigation of the expression and adhesin function of H7 flagella in the interaction of *Escherichia coli* O157 : H7 with bovine intestinal epithelium. *Cell Microbiol*. 2009 Jan;11(1):121-37.
- Manning, E. J. and Collins, M. T. (2001). *Mycobacterium avium* subsp *paratuberculosis*: pathogen, pathogenesis and diagnosis. *Revue Scientific et Technique, OIE*, 10: 133-150.
- McIntyre, G. and Stanford, J. L. (1986). Immunodiffusion analysis shows that *Mycobacterium paratuberculosis* and other mycobactin-dependant mycobacteria are variants of *Mycobacterium avium*. *Journal of Applied Bacteriology*, 61: 295-298.
- Millar, D., Ford, J. S., Sanderson, J., Withey, S. J., Tizard, M. L., Doran, T. and Hermon-Taylor, J. (1996). IS900 PCR to detect *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in retail supplies of whole pasteurized cow's milk in England and Wales. *Applied Environmental Microbiology*, 62: 3446-3452.
- Mitchell, R. M., Stehman, S. M., Whitlock, R. H., Benedictus, A. and Schukken, Y. H. (2005). A deterministic mathematical model of *Mycobacterium avium* subsp *paratuberculosis* transmission on commercial US dairy farms. In: Proceedings of the 8th International Colloquium on Paratuberculosis. Manning, E. J. B and Nielsen S. S. eds. Copenhagen 14-18 August.
- Möller A., Truyen U., Roesler U., 2007. *Prototheca zopfii* genotype 2—The causative agent of bovine protothecal mastitis?. *Veterinary Microbiology* 120, 370-374
- Momotami, E., Whipple, E., Thiermann, A. and Cheville, N. (1988). Role of M cells and macrophages in the entrance of *Mycobacterium paratuberculosis* into domes of ileal Peyer's patches in calves. *Veterinary Pathology*, 25: 131-137.
- Morandi S., Brasca M., Lodi R., Cremonesi P., Castiglioni B., 2007. "Detection of classical enterotoxins and identification of enterotoxin genes in *Staphylococcus aureus* from milk and dairy products". *Veterinary microbiology*, vol. n. 124, pag: 66-67.

- Muskens, J., Barkema, H. W., Russchen, E., van Maanen, K., Schukken, Y. H., Bakker, D. (2000). Prevalence and regional distribution of paratuberculosis in dairy herds in the Netherlands. *Veterinary Microbiology*, 77: 253-261
- Naser, S. A. (2000). Isolation of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* from breast milk of Crohn's disease patients. *American Journal of Gastroenterology*, 95: 1094-195.
- Netherlands Milk and Dairy Journal 38, 183–194.
- Neul C, Bulois P., Desreumaux P., et al. Changes in the bacterial flora of the noeterminal ileum after ileocolic resection for Crohn's disease. *Am J Gastroenterology* (2002); 97:939-946.
- Nielsen, S. S., Thamsborg, S. M., Houe, H. and Bitch V. (2000). Bulk-tank milk ELISA antibodies for estimating the prevalence of paratuberculosis in Danish dairy herds. *Preventive Veterinary Medicine*, 44: 1-7.
- Nigard K., Andersson Y., Rottingen J.A., Svensson A., Lindback J., Kistemann T., 2004. "Association between environmental risk factors and *Campylobacter* infections in Sweden". *Epidemiology and infections*, vol. n. 132, pag: 318.
- O'Reilly, C. E., O'Connor, I., Anderson, W., Harvey, P., Grant, I. P., Donaghy, J., Rowe, M. and O'Mahony, P. (2004). Surveillance of bulk raw and commercially pasteurized cows' milk from approved Irish liquid-milk pasteurization plants to determine the incidence of *Mycobacterium paratuberculosis*. *Applied and Environmental Microbiology*, 71: 5138-5144.
- Ogura, Y., Bonen, D. K., Inohara, N., Nicolae, D. L., Chen, F. F., Ramos, R., Britton, H., Moran, T., Karaliuskas, R., Duerr, R. H., Achkar, J. P., Brant, S. R., Bayless, T. M., Kirschner, B. S., Hanauer, S. B., Nunez, G. and Cho, J. H. (2001). A frameshift mutation in Nod2 associated with susceptibility to Crohn's disease. *Nature*, 411: 603-606.
- Oliver, S.P., Jayarao, B.M., Almeida, R.A., 2005. Foodborne pathogens in milk and the
- Olsen, I., Sigurdosdottir, O. G. and Donne, B. (2002). Paratuberculosis with special reference to cattle. A review. *Veterinary Quarterly*, 24: 12-28.
- On S.L.W., 2001. "Taxonomy of *Campylobacter*, *Arcobacter*, *Helicobacter* and related bacteria: current status, future prospects and immediate concerns". *Journal of applied microbiology*, vol. n., pag: S2, S4.
- Orr, K.E., Lightfoot, N.F., Sisson, P.R., Harkis, B.A., Tweddle, J.L., Boyd, P., Carroll, A., Jackson, C.J., *Pathogens and Disease* 2, 115–129.
- Pauleau, A. L. and Murray, P. J. (2003). Role of NOD2 in the response of macrophages to toll like receptor agonists. *Molecular and Cellular Biology*, 23: 7531-7539.
- Pearce, L. E., Truong, H. T., Crawford, R. A., Yates, G. F., Cavaignac, S. and deLisle, G. W. (2001). Effect of turbulent flow pasteurization on survival of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* added to raw milk. *Applied and Environmental Microbiology*, 67: 3964-3969.
- Peles F., Wagner M., Varga L., Hein I., Rieck P., Gutser K., Kereszturi P., Kardos G., Turcsányi I., Bèri B., Szabò A., 2007. "Characterization of *Staphylococcus aureus* strains isolated from bovine milk in Hungary". *International journal of food microbiology*, vol. n. 118, pag: 186-187.
- Perez, V., Garcia-Marin, J. F. and Badiola, J. J. (1996). Description and classification of different types of lesions associated with natural paratuberculosis infection in sheep. *Journal of Comparative Pathology*, 114: 107-122.
- Pore R.S. (1985). Prototheca taxonomy. *Micopathology*. 90:129-139.
- Robbi, C., Rossi, I., Nardelli, S., Rossi, E., Toson, M., Marangon, S., Vincenti, G. and Vicenzoni, G. (2002). Prevalenza di paratuberculosis (Johne's disease) nella popolazione di bovine da latte della regione Veneto. In: *Atti della SIB volume XXXIV*, 283-288.
- Robertshaw, P.A., Counter, D.E., 1985. Evidence of udder excretion of *Campylobacter*

- Roesle U., Hensel A., 2003. *Longitudinal Analysis of Prototheca zopfii-Specific Immune Responses: Correlation with Disease Progression and Carriage in Dairy Cows*. *Journal of Clinical Microbiology* 41, 1181-1186
- Rossiter, C. A. and Burhans, W. S. (1996). Farm specific approach to paratuberculosis (johne's disease) control. *Veterinary Clinics of North America. Food Animal Practice*, 12: 383-415.
- Rossiter, C. J. and Henning, W. R. (2001). Isolation of *Mycobacterium paratuberculosis* from thin market cows at slaughter. *Journal of Animal Science*, 79: 113.
- Schreiner D. A., Ruegg P. L., 2002. Effects of tail docking on milk quality and cow cleanliness. *Journal of Dairy Science*, 85:2503–2511.
- Schreiner D. A., Ruegg P. L., 2003. Relationship between udder and leg hygiene scores and subclinical mastitis. *Journal of Dairy Science*, 86:3460–3465.
- Sechi, L., Gazouli, M., Ikonopoulou, J., John, C., Lukas, M., Scanu, A., Ahmed, N., Fadda, G. and Zanetti, S. (2005). *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*, Genetic susceptibility to Crohn's disease, and Sardinians: the way ahead. *Journal of Clinical Microbiology*, 43: 5275-5277.
- Secott, T. E., Lin, T. L. and Wu, C. C. (2002). Fibronectin attachment protein is necessary for efficient attachment and invasion of epithelial cells by *Mycobacterium avium* subsp *paratuberculosis*. *Infection and Immunity*, 70: 2670-2675.
- Secott, T. E., Lin, T. L. and Wu, C. C. (2004). *Mycobacterium avium* subsp *paratuberculosis* fibronectin attachment protein facilitates M-cell targeting and invasion through a fibronectin bridge with host integrins. *Infection and Immunity*, 72: 3724-3732.
- Secott, T. E., Lin, T. L. and Wu, C. C. (2001). Fibronectin attachment protein homologue mediates fibronectin binding by *Mycobacterium avium* subsp *paratuberculosis*. *Infection and Immunity*, 69: 2075-2082.
- Serna A, Boedeker EC. Pathogenesis and treatment of Shiga toxin-producing Esherichia Coli infections. *Curr. Opin. Gastroenterol.* 2008;24(1):36-47
- Severino P., Dussurget O., Vencio R.Z.N., Dumas E., Garrido P., Padilla G., Piveteau P., Lemaitre J.P., Kunst F., Glaster P., Buchrieser C., 2007. "Comparative transcriptome analysis of *Listeria monocytogenes* strains of the two major lineages reveals differences in virulence, cell wall and stress response". *Applied and environmental microbiology* vol. n. 7, pag: 6078-6079.
- Sigurdardottir, O. G., Bakke-McKellep, A. M., Djonje, B. and Evenson, O. (2005). *Mycobacterium avium* subsp *paratuberculosis* enters the small intestinal mucosa of goat kids in areas with and without Peyer's patches as demonstrated with the averted sleeve method. *Comparative immunology Microbiology and Infectious Diseases*, 28: 223-230.
- Sigurdardottir, O. G., Press, C. McL. and Saxwgaard, F. (1999). Bacterial isolation, immunological response and histological lesions during the early subclinical phase of experimental infection of goat kids with *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. *Veterinary Pathology*, 36: 542-550.
- Sigurdardottir, O. G., Valheim, M. and Press, C. McL. (2004). Establishment of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* infection in the intestine of ruminants. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 56: 819-834.
- Spahr, U. and Schafroth, K. (2001). Fate of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in Swiss hard and semi hard cheese manufactured from raw milk. *Applied and Environmental Microbiology*, 67: 4199-4205.
- Srikanth CV, Cherayil BJ. 2007 Intestinal innate immunity and the pathogenesis of Salmonella enteritis. *Immunol Res.*;37(1):61-78.

- Stamm, Melanie Mohr, Philip S. Bridger, Elmar Schröpfer, Matthias König, William C. Stoffregen, Evelyn A. Dean-Nystrom, Georg Baljer, and Christian Menge. 2008 *Epithelial and Mesenchymal Cells in the Bovine Colonic Mucosa Differ in Their Responsiveness to Escherichia coli Shiga Toxin 1 Infection and Immunity*, 76(11):5381-5391
- Streeter, R. N., Hoffis, G. F., Bech-Nielsen, S., Shulaw, W. P. and Rings, M. (1995). Isolation of *Mycobacterium paratuberculosis* from colostrum and milk of subclinically infected cows. *American Journal of Veterinary Research*, 56: 1322-1324.
- Sung J.M.L., Lloyd D.H., Lindsay J.A., 2008. "Staphylococcus aureus host specificity: comparative genomics of human versus animal isolates by multi-strain microarray". *Microbiology-SGM*, vol. n. 154, pag:1949.
- Sung, N. and Collins, M. T. (2000). Effect of three factors in cheese production (pH, salt and Heat) on *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* viability. *Applied and Environmental Microbiology*, 66: 1334-1339.
- Sweeney, R. W., Wittlock, R. H. and Rosenberger, A. E. (1992). *Mycobacterium paratuberculosis* cultured from milk and sopramammary lymph nodes of infected asymptomatic cows. *Journal of Clinical Microbiology*, 30:166-171.
- Swidsinski A, Ladhoff A, Pernthaler A, et al. Mucosal flora in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* (2002); 122:44-54.
- Thevenot D, Delignette-Muller ML, Christieans S, Vernozy-Rozand C, 2005. Fate of *Listeria monocytogenes* in experimentally contaminated French sausages. *Int. J. Food Microbiol* 101:189-200
- Timoney, J. F., Gillespie, J. H., Scott, F. W. and Barlough, J. E. (1995). Hagan Bruner: *Microbiologia e malattie infettive degli animali domestici*. Ed. Grasso, 3a edizione, Bologna.
- Van Kruiningen, H. J., Chiodini, R. J., Thayler, W. R., Contu, J. A., Merkal, R. S. and Runnels, P. L. (1986). Experimental disease in infant goats induced by a *Mycobacterium* isolated from a patient with Crohn's disease. *Digestive Disease Science*, 31: 1351-1360.
- Wall, S., Kunze, Z. M. and Saboor, S. (1993). Identification of a spheroplast-like agent isolated from tissues of patients with Crohn's disease and control tissues by polymerase chain reaction. *Journal of Clinical Microbiology*, 31: 1241-1245.
- Wareing, D.R., Freeman, R., 1995. Direct milk excretion of *Campylobacter jejuni* in a dairy
- Weber, M. F., Kogut, J., de Bree, J. and van Schaik, G. (2005). Evidence for *Mycobacterium avium* subsp *paratuberculosis* shedding in young stock. In: *Proceedings of the 8th International Colloquium on Paratuberculosis*. Manning, E. J. B and Nielsen S. S. eds. Copenhagen 14-18 August.
- Weigand, P. V. and Goethe, R. (1999). Pathogenesis of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* infections in ruminants: still more questions than answers. *Microbes and Infection*, 1: 1121-1127.
- Yoon J.W. Hovde C.J., 2008. "All blood, no stool: enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 infection". *Journal of Vet. Science* pag 219-231.

APPENDICE

Durante questi tre anni di studio, l'esperienza acquisita durante la processazione e l'analisi dei campioni oggetto della tesi, mi ha consentito di collaborare ad altri filoni di ricerca in corso presso la sezione di Malattie Infettive del Dipartimento di Patologia Animale, Igiene e Sanità Pubblica Veterinaria. Di seguito vengono riportati i risultati di questi lavori.

APPENDICE A

POSTER PRESENTATO ALL'EUROPEAN BUIATRICS FORUM 2009

“STUDIO DI CAMPO SULLE POSSIBILI CAUSE DI REAZIONI ATIPICHE AL TEST INTRADERMICO DELLA TUBERCOLINA”

C.Dal Monte, B. Bignami, S.Panelli, A.zecconi, R. Piccinini

Stato dell'arte

Questo studio di campo è stato effettuato in Val d'Aosta, nel nord-est Italia, dove sovente sono state riportate reazioni al test intradermico della tuberculina (IDT), nonostante livelli di prevalenza molto bassi di tubercolosi bovina. Si è ipotizzato che *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (MAP) sia la causa di queste reazioni anomale all'IDT nella vacche della regione, ma non sono riportati dati oggettivi in merito. Questo articolo riporta i dati di campo relativi alla valutazione contemporanea di reazioni all'IDT e presenza di infezioni di MAP.

Materiali e metodi

Abbiamo testato 80 vacche sulla base della loro reazione all'IDT negli ultimi tre anni effettuate durante i test annuali di controllo della tubercolosi bovina. Abbiamo comparato IDT con un test ELISA su sangue e la Real-time PCR sulle feci per il MAP.

Risultati

I risultati hanno messo in luce che il 3,75% dei campioni erano positivi al test ELISA, l'1,25% erano dubbi, e il 20% debolmente negativi. Solo il 2,5% dei campioni è risultato positivo alla PCR. Relativamente alla prova comparativa con l'IDT solo una vacca è risultata positiva, una dubbia, ma entrambe erano negative alla necropsia ed ai successivi test per TBC. Quando i risultati ELISA sono stati comparati con IDT della tuberculina aviare, un significativo numero di negativi deboli è risultato appartenere alla razza Castana Valdostana, a differenza degli

animali negativi deboli e positivi appartenenti alla Pezzata Rossa Valdostana. Inoltre la razza Castana Valdostana ha dimostrato un significativo basso rapporto alla positività alla PCR per MAP.

Conclusioni

La paratubercolosi non sembra essere responsabile delle risposte anomale al test dell'IDT verificatesi nel corso dei test per TBC annuali. La risposta alla tubercolina aviare e l'ampio numero di negativi deboli all'ELISA suggeriscono che un altro micobacterio del tipo aviare possa essere il responsabile delle anomalie. Questo studio ha inoltre dimostrato una reattività significativa della Castana Valdostana negativa debole al test ELISA comparata con la Pezzata Rossa debole negativa e positiva. Tali dati suggeriscono che sussista una differente risposta cellulare immunitaria in queste due razze e che probabilmente presentino una differente capacità di resistenza al micobacterio.

APPENDICE B

POSTER PRESENTATO ALL'EUROPEAN BUIATRICS FORUM 2009

“STUDIO DI CAMPO SULLE POTENZIALI FONTI DI PATOGENI EMERGENTI NEL LATTE CRUDO”

R. Piccinini, B.Bignami, M.Zuccalli, M.Mazzilli

Stato dell'arte

Recentemente sta aumentando l'interesse dei consumatori relativamente al latte crudo ed alle foodborne disease da patogeni emergenti. Lo scopo di questo lavoro è quello di valutare la reale presenza di tali batteri in diverse aziende bovine.

Materiali e metodi

L'indagine è stata effettuata su 24 stalle dell'area Milano-Lodi, scelte in base alla conta batterica totale del latte di massa (BMTBC) registrata negli ultimi tre anni. 5 aziende avevano sempre meno di 10.000UFC/ml, mentre le altre 19 avevano le cellule in un range compreso tra le 80 e le 100.000UFC/ml. In tutte le aziende le vacche sono alloggiare in cuccette e la sala di mungitura è a lisca di pesce. Sono stati campionati latte di massa, il filtro di mungitura e tre campioni dei feci ambientali (sala parto, corsia di alimentazione e sala d'attesa). Ogni campione è stato indagato per *S.aureus*, *Salmonella spp.*, *L.monocytogenes*, *Campylobacter spp.*, *EHEC*, *Yersinia enterocolitica* e MAP. I presunti casi d'isolamento di tali

batteri sono stati confermati mediante PCR. La presenza di MAP è stata indagata mediante Real Time-PCR.

Risultati

Solamente *S.aureus* è stato rinvenuto frequentemente e con una carica alta, nei campioni di latte di massa delle aziende caratterizzate da cattive condizioni igieniche (BMTBC >80.000UFC/ml). Il MAP ha dimostrato una frequenza paragonabile ,ma con una distribuzione random. Con l'eccezione della *Yersinia enterocolitica*, che è stata isolata in un'azienda, nessuno degli altri patogeni è mai stato rinvenuto nel latte e nel filtro. Il 29% dei campioni ambientali rivela la presenza di EHEC e/o MAP, mentre né *Salmonella* né *Campylobacter* sono mai stati rinvenuti.

Conclusioni

Quando durante la mungitura vengono adottate le corrette norme igieniche, il rischio che i patogeni emergenti finiscano nel latte di massa è veramente minimo. Tuttavia la salubrità della ghiandola mammaria delle vacche, rappresente il principale punto critico per la sicurezza del latte.

APPENDICE C

PRESENTAZIONE AL VII CONGRESSO NAZIONALE MASTITIS COUNCIL ITALIA 23 MAGGIO 2009

IL PIANO DI CONTROLLO DELLA PARATUBERCOLOSI NEL PERI-PARTO:È EFFICACE?

Il morbo di Johne rappresenta ogni anno una delle maggiori cause di perdite economiche per gli allevamenti bovini da carne e da latte di tutto il mondo (Stabel 2007).

L'agente eziologico della paratubercolosi è il *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (MAP), un batterio acido resistente a lenta crescita difficile da coltivare in vitro, in grado di persistere per mesi nell'ambiente. Evidenze scientifiche suggeriscono che sia in grado di resistere nelle acque e nel terreno per un periodo di tempo che varia tra 300 e 600 giorni (Pickup et al., 2005; Whittington et al., 2005).

Nel bovino questo microrganismo causa un'enterite granulomatosa cronica, che si manifesta clinicamente con diarrea profusa e persistente, calo delle produzioni, progressivo dimagrimento ed esito sempre letale.

La via privilegiata d'infezione è quella oro-fecale ed i soggetti sensibili all'infezione sono soprattutto i vitelli nei primi mesi di vita (Seiz 1989; Stabel 2000). Avendo rinvenuto il batterio sia nel latte di soggetti clinici (Giese 2000, Taylor 1981) che subclinici (Streeter 1995, Sweeney, 1992) il colostro è stato considerato la via di infezione dei vitelli.

In particolare la massima recettività all'infezione si riscontra negli animali di età inferiore ad un anno (Olsen et al., 2002), anche se l'infezione sperimentale di animali adulti dimostra che l'immunità non è mai assoluta (Tessema et al., 2001). La maggior recettività dei giovani è ampiamente riportata in letteratura e potrebbe dipendere sia da un incompleto sviluppo del sistema immunitario, sia da un più facile insediamento del batterio nella mucosa intestinale attraverso le placche di Peyer. Il maggior sviluppo delle placche ileali potrebbe quindi facilitare l'insediamento del MAP (Clarke, 1997). Infatti il tessuto linfoide dell'intestino, molto sviluppato nei primi mesi di vita del vitello, con il progredire dell'età si atrofizza (Manning e Collins, 2001).

L'evoluzione della malattia è lenta e la manifestazione clinica conclamata compare anni dopo l'infezione.

Tuttavia per comprendere le diverse manifestazioni che questa malattia può assumere in allevamento, è necessario tenere conto del fatto che non tutti gli animali che vengono in contatto con MAP s'infettano in modo persistente e che non in tutti gli animali pertanto si svilupperà la forma clinica.

Non è ancora stato possibile infatti spiegare come sia possibile che solo il 10-15% degli animali che entra in contatto con MAP sviluppi poi la malattia (Olsen et al., 2002), mentre la maggior parte dei vitelli sia in grado di eliminare l'infezione (Perez et al., 1996; Sigurdadottir, 2004).

Uno dei punti critici del controllo di questo patogeno in azienda è rappresentato dalla difficoltà di rinvenimento del batterio nelle feci degli infetti. Infatti negli animali con infezione subclinica, l'eliminazione del patogeno nelle feci si può protrarre per

periodi variabili, da 1 a due anni e mezzo, prima che compaia la forma clinica (Merkal 1968, Whitlock, 1996).

Pertanto una precoce diagnosi di tali soggetti è necessaria per contenere il dilagare della malattia, perché il controllo del patogeno dipende dal rinvenimento e dall'eliminazione dei soggetti infetti il più rapidamente possibile (Sangeeta 2004).

L'attuale test diagnostico considerato gold standard è la coltura su terreno selettivo Herrold's egg yolk medium, su cui il batterio può impiegare dalle 12 alle 16 settimane per crescere.

Si è reso pertanto necessario individuare un metodo più rapido, sensibile e specifico per diagnosticare la presenza del batterio. Negli anni numerosi studi hanno dimostrato che la real-time PCR è un metodo sensibile, specifico, rapido e meno dispendioso rispetto alla coltura batterica (Sangeeta 2004, Kimberly 2007, O'Mahory 2004, Schönenbrücher 2008).

Considerate le necessità aziendali relative alla paratubercolosi, è sembrato opportuno elaborare un piano di controllo che limitasse la diffusione del batterio in allevamento. Per farlo è stato tenuto conto dei punti critici quali la trasmissione tra madre e vitello e l'individuazione dei soggetti subclinici. Secondo Collins (2002), in un allevamento in cui sia stato diagnosticato un caso di paratubercolosi, è necessario ritenere già come possibile fonte d'infezione animali con basso livello di titoli anticorpali (negativi deboli). All'aumentare del valore del titolo anticorpale aumenta la probabilità che il soggetto sia infetto. Pertanto è necessario privare del colostro materno i vitelli le cui madri siano risultate anche solo negative deboli al test ELISA.

E' stata utilizzata una metodica consolidata quale l'ELISA ed una innovativa, sensibile e specifica quale la real-time PCR.

La decisione di utilizzare questa metodica è legata alla necessità di fornire agli allevatori dei risultati attendibili, in tempi brevi e con un costo contenuto.

MATERIALI E METODI

Il piano di controllo descritto in questo lavoro consiste nel monitoraggio del peri-partum e

si articola in due fasi: l'analisi del siero di sangue degli animali in asciutta e l'analisi delle feci nel post-partum.

Si effettua un iniziale screening sierologico e si analizzano le feci degli animali risultati negativi deboli, dubbi o positivi alla ricerca anticorpale.

Nel momento in cui si rinviene il batterio nelle feci, l'animale viene considerato eliminatore e pertanto pericoloso per la diffusione aziendale. Di conseguenza viene consigliato all'allevatore l'eliminazione del soggetto, al termine della lattazione corrente. Ai vitelli non viene somministrato colostro materno nel caso in cui la vacca sia risultata negativa debole, dubbia o positiva al test sierologico.

Il sangue degli animali viene prelevato durante l'asciutta e posto in vacutainer contenenti EDTA.

In laboratorio viene centrifugato a 2000 rpm per 15 minuti ed il siero che ne risulta viene analizzato mediante un kit commerciale ELISA anticorpo (Pourquiere ELISA Paratuberculosis Antibodies screening).

Per la lettura ottica dei campioni si utilizza uno spettrofotometro Spectra Max ed i risultati della lettura vengono elaborati con il programma SoftMax Pro 4.8.

I risultati vengono quindi classificati in quattro ranges di valori: da 0 a 0.15 S/P il campione è negativo; da 0.16 a 0.32 S/P il campione è negativo debole; da 0.33 a 0.53 è dubbio, oltre 0.53 S/P è positivo.

Le feci vengono analizzate 15 giorni dopo il parto, per una ricerca diretta del batterio mediante real-time PCR.

Utilizzando un kit commerciale Adiapure purification ed un Mix Miller, il DNA viene estratto e purificato. Sul template di DNA viene eseguita una real-time PCR e l'amplificazione ha luogo in uno strumento Opticon 2 (Bio-Rad, California, USA). I primers, la sonda ed il protocollo termico in uso sono quelli riportati da Khare et al. nel 2004 che amplificano un segmento della sequenza IS900 del peso di 133 bp.

Sono stati analizzati in totale 1521 campioni di cui 202 con real-time PCR e 1319 mediante ELISA.

RISULTATI

Nei quattro anni di applicazione del piano, i valori di prevalenza e incidenza del MAP in questo allevamento sono andati decrescendo.

Sono state effettuate delle stime percentuali annuali dei risultati ELISA e di quelli real-time PCR ed è stato effettuato un confronto tra i diversi anni.

Le positività ELISA sono andate riducendosi da un iniziale valore di 13.45% a 1.72% (171 test effettuati di cui 23 risultati positivi). In concomitanza i dubbi e i negativi deboli sono diminuiti rispettivamente da 5.26% a 0 e da 10.52% a 0. Il valore più significativo è rappresentato dai risultati negativi che sono cresciuti da un iniziale 70.76% fino al 98.97% dell'anno corrente.

Altrettanto significativi sono gli andamenti delle percentuali relative alla real-time PCR. Anche per questi sono stati effettuate le stime percentuali annuali di ciascuna categoria di risultati e sono stati confrontati fra loro i vari anni.

Il piano prevede l'analisi delle feci solo in seguito ad un risultato negativo debole, dubbio o positivo all'ELISA. Di conseguenza il numero decrescente di questi dati negli anni ha avuto come riflesso una diminuzione del numero di esami delle feci. L'iniziale prevalenza del 5.56% si è ridotta a zero negli ultimi due anni; il numero di indagini sulle feci è

passato da un massimo di 72 nel 2006 all'anno corrente in cui al momento è stata effettuata una sola analisi real-time PCR, risultata negativa.

DISCUSSIONI E CONCLUSIONI

La paratubercolosi è divenuta uno dei maggiori problemi per gli allevamenti di bovini da carne e da latte: pertanto si è reso necessario approntare un piano di controllo efficace e che mirasse a diminuire la diffusione del batterio in azienda.

Innanzitutto è necessario evitare che gli animali giovani vengano in contatto con il batterio, vista la loro maggiore recettività. Come riportato da Collins già gli animali negativi deboli potrebbero rappresentare una fonte di rischio, considerato che il batterio viene eliminato anche nel latte. I dati ottenuti con l'applicazione del piano mostrano come nonostante il tasso di negativi deboli nel 2007-2008 si sia alzato, il numero dei positivi al batterio sia sempre diminuito. Se anche negli adulti il tasso anticorpale non è mai scomparso del tutto, non si è assistito ad un aumento di nuovi casi di infetti (incidenza). Questo si evince considerando che gli animali che

all'inizio del piano erano vitelli, attualmente sono animali adulti. L'aver evitato che entrassero in contatto col batterio, ha fatto sì che la percentuale di negativi ELISA 2008-2009 sia rispettivamente del 98 e 100%, che corrisponde ad una negatività delle feci del 98% nel 2008 e del 100% del 2009, per i dati sino ad ora analizzati.

Rilevante è stato l'utilizzo di metodiche che permettessero una più rapida diagnosi e pertanto un più rapida possibilità d'intervento sui soggetti malati. I dati hanno confermato la validità dell'utilizzo della real-time PCR come metodica per la diagnosi diretta del batterio, poiché permette l'individuazione dei soggetti malati in modo sicuro e rapido.

Il comportamento consigliato di fronte agli infetti si è rivelato efficace.

Potendo eliminare il batterio sia mediante il latte che nelle deiezioni, rappresentano il vero rischio per l'allevamento, soprattutto se si considera che il batterio persiste a lungo nel terreno, aumentando la possibilità d'infezione degli animali recettivi. La loro eliminazione dall'effettivo rimane pertanto altamente consigliata. Non essendo ancora stata dimostrata la natura zoonosica del MAP, non si rende necessario eliminare l'animale immediatamente dopo la diagnosi. Si consiglia pertanto di far concludere la lattazione alla vacca, di non ingravidarla e di macellarla a termine della lattazione corrente. Il suo rendimento infatti andrà diminuendo col progredire della malattia.

Dai dati ottenuti emerge la validità del controllo del peri-partum, che risulta essere il periodo a maggior rischio d'infezione.