

MYCOBACTERIUM AVIUM SUSP. PARATUBERCULOSIS NELLA FILIERA LATTIERO CASEARIA

MYCOBACTERIUM AVIUM SUSP. PARATUBERCULOSIS IN DAIRY PRODUCTION

Marchetti G., Coccollone A., Giacometti F., Riu R., Serraino A.
Dipartimento di Scienze Mediche Veterinarie - Università di Bologna

ABSTRACT

Mycobacterium avium subsp. *paratuberculosis* (MAP) is the etiologic agent of paratuberculosis. The disease affects cows and other ruminants and causes high economic losses, mainly for dairy production. MAP may also have a role in the development of Crohn's disease in humans. Infected animals shed viable MAP with milk and faeces and humans may assume MAP via the consumption of contaminated milk and dairy products. Current methods of milk pasteurization are not sufficient to kill all MAP cells present in milk and MAP has been found in raw or pasteurized milk and isolated from cheese. The aim of this paper is to review the current knowledge about MAP in dairy production. We analyzed studies on milk contamination, effect of pasteurization and methods for identification of MAP that can be applied to dairy products.

KEYWORDS

Mycobacterium avium susp. *paratuberculosis*, dairy products

INTRODUZIONE

La paratubercolosi è una malattia infettiva del bovino, dell'ovino e di alcuni ruminanti selvatici, conosciuta anche come Malattia di Johne o Mal del Canale. Si tratta di un'enterite granulomatosa infettiva ad andamento cronico e progressivo con conseguente diarrea e grave decadimento delle condizioni generali dell'animale.

L'agente eziologico della malattia è *Mycobacterium avium* susp. *paratuberculosis* (MAP). Come tutti i micobatteri è acido-alcol resistente, molto resistente al calore, ai disinfettanti e agli agenti ambientali e rimane infettante a lungo anche nel terreno. Il MAP è inoltre un patogeno intracellulare obbligato a causa della sua incapacità a produrre micobactina.

La paratubercolosi, nel comparto lattiero caseario, viene considerata una patologia particolarmente importante dal punto di vista economico, a causa delle perdite che comporta nella produzione del latte e quindi nell'economia complessiva delle aziende (6; 7; 28; 42). Studi svolti negli Stati Uniti (14; 54) evidenziano che le perdite annuali dovute alla paratubercolosi si attestano, negli USA, tra i 200 e i 250 milioni di dollari. Monitoraggi sierologici effettuati a livello internazionale stimano che il 7-40% degli alle-

vamenti sia infetto (45; 53; 78) e, secondo Stabel (66), il 40% circa delle mandrie di vacche da latte ne è affetto. Nielsen *et al.* (49, 50) hanno eseguito uno studio sierologico su latte di massa proveniente da 6 differenti zone della Danimarca ed hanno riscontrato anticorpi per MAP in 423 (47%) dei 900 campioni esaminati. La prevalenza della paratubercolosi negli allevamenti europei è stimata tra il 7% e il 55%, mentre in quelli australiani si attesta tra il 9% e il 22% (45). Per quanto riguarda la prevalenza della paratubercolosi in Italia, in bibliografia sono presenti i dati relativi ad alcuni studi condotti in diverse regioni del Paese. La prevalenza stimata negli allevamenti della Lombardia è risultata essere, in uno studio del 2003, del 19,2%, mentre i capi sieropositivi sono risultati il 2,6% (2). In uno studio condotto nel 2004 in una zona pedemontana della Lombardia, da Liandris *et al.* (43), gli allevamenti con almeno un animale positivo sono risultati essere il 76,5%. Nel Lazio la prevalenza è risultata essere del 35% (44), nel Veneto del 26,7% (58). La disomogeneità tra i risultati ottenuti dai differenti autori è imputabile ai diversi protocolli sperimentali utilizzati nonché a differenti strumenti statistici impiegati nell'elaborazione dei dati.

Oltre alle notevoli perdite economiche, MAP sta

acquisendo interesse per una sua possibile correlazione eziologica con il morbo di Crohn dell'uomo, correlazione a lungo sospettata, ma che ancora non è stata dimostrata. Il morbo di Crohn è una patologia infiammatoria cronica dell'apparato digerente, la cui eziologia non è stata ancora del tutto chiarita, che colpisce prevalentemente soggetti giovani tra i 15 e i 25 anni e che ha in comune con la paratubercolosi sia i principali segni clinici, rappresentati da perdita di peso e diarrea, che i reperti anatomo-patologici, ossia il prevalente interessamento dell'ileo e la presenza di infiammazioni granulomatose (13; 36). La presenza di MAP nell'intestino è stata riscontrata nel 52-92% di pazienti affetti da morbo di Crohn e nel 5-26% dei casi controllo tramite analisi in PCR (4; 10). Numerose però sono anche le differenze tra le due patologie e per questo motivo l'opinione dei gastroenterologi rimane ancora divisa sul ruolo che MAP potrebbe avere nell'eziologia della malattia dell'uomo. Attualmente, una delle ipotesi è che il morbo di Crohn avrebbe un'eziologia multifattoriale, con una certa predisposizione genetica, influenzata da fattori esterni e da fattori legati all'ospite. Sarebbe dunque l'insieme di questi fattori ad indurre un deficit della funzione immunitaria della mucosa (12) che è alla base della patogenesi del morbo di Crohn. Ad oggi si può affermare con certezza l'esistenza di una associazione tra MAP e morbo di Crohn ma non necessariamente un rapporto di causa-effetto (35).

ELIMINAZIONE DI MAP ATTRAVERSO IL LATTE

E' noto che MAP può essere isolato dal latte di vacche clinicamente affette da paratubercolosi (17; 65; 77). E' probabile che MAP sia presente nei monociti, abbondanti nel latte, ma anche a livello extracellulare. Lavori recenti dimostrano, inoltre, che MAP può essere isolato dal latte di vacche che non mostrano segni clinici riferibili a paratubercolosi, ma che in realtà albergano un'infezione subclinica (22). Sweeney *et al.* (75) hanno isolato MAP dal latte del 19% di vacche senza segni clinici che eliminavano grandi quantità del microrganismo con le feci e dal latte del 5% di vacche senza segni clinici che eliminavano MAP attraverso le feci con frequenza bassa o intermedia. Streeter *et al.* (73) hanno esaminato colostro e latte di vacche asintomatiche che risultavano positive alla coltura delle feci; MAP è stato isolato dal 22,2% dei campioni di colostro e dall'8,3% dei campioni di latte analizzati e l'eliminazione con il colostro è risultata più frequente nelle vacche che presentavano elevata eliminazione fecale.

La eliminazione di MAP nel latte è correlata al

livello di sieroprevalenza nella mandria: una maggior percentuale di campioni di latte provenienti da mandrie con un alto livello di sieroprevalenza è risultata positiva (46,7%) rispetto a quella dei campioni provenienti da mandrie con livelli di sieroprevalenza moderati o bassi (10,8% e 4,4% rispettivamente) (3). Dovrebbe, inoltre, essere sottolineato che l'effettuazione di campionamenti ripetuti determina un aumento di risultati positivi (3), in quanto l'eliminazione di MAP col latte può essere intermittente (48). Ad ogni modo, le informazioni sull'entità della contaminazione da MAP nel latte sono scarse. Giese e Ahrens (27) riportano che una vacca che presenta segni clinici di malattia elimina col latte meno di 100 UFC/ml, mentre un animale asintomatico può eliminare 2-8 UFC/50 ml di latte (75). A causa delle difficoltà legate alla conta di MAP con metodi colturali, è comunque verosimile che questi dati siano sottostimati (31).

CONTAMINAZIONE DA MAP DEL LATTE DI MASSA

La presenza di MAP nel latte di massa è dovuta, in larga misura, a contaminazione fecale. La maggior fonte di contaminazione da MAP nel latte è considerata la contaminazione fecale dei capezzoli (67; 73; 75). Ne consegue che un ruolo fondamentale per ridurre la contaminazione è svolto dall'applicazione di corrette prassi igieniche a livello di azienda di produzione primaria. La portata della contaminazione fecale del latte da parte di MAP, essendo strettamente legata alla quantità di MAP eliminata con le feci e alle condizioni igieniche dell'allevamento, è difficilmente prevedibile (3). Considerando che potenzialmente l'eliminazione di MAP con le feci può essere elevata, il latte di una singola bovina può contenere ben oltre le 100 UFC/ml citate in precedenza. Tuttavia la miscelazione del latte contaminato con latte proveniente da vacche non infette determina un effetto diluizione tale per cui il latte di massa risulta contaminato solitamente a livelli molto bassi. La natura casuale della contaminazione fecale fa sì che il livello di contaminazione di MAP nel latte di massa di aziende infette sia soggetto a variazioni continue (68). Herthnek *et al.* (40) hanno verificato la correlazione tra la presenza di MAP nel latte di massa, ricercato attraverso l'uso della PCR, e la presenza di MAP in campioni di feci prelevati dall'ambiente, messa in evidenza attraverso la tecnica colturale. Su 56 allevamenti di vacche da latte coinvolti nello studio, il 68% è risultato positivo alla coltura ambientale, mentre il 30% è risultato positivo alla PCR sul latte di massa. Gli autori sottolineano come, benché MAP possa essere presente direttamente nel latte o essere

contaminato durante la mungitura, nel latte di massa viene rilevato in basse concentrazioni, sia per l'effetto diluizione sia grazie alle generiche misure di igiene messe in atto nelle aziende. Per questo motivo la concentrazione di MAP nel latte può spesso essere inferiore al limite analiticamente rilevabile.

Per quanto riguarda i dati bibliografici relativi alla prevalenza di MAP nel latte di massa, uno studio effettuato in Svizzera da Stephan *et al.* (71) ha evidenziato che, su 501 campioni esaminati, 112 (22,4%) sono risultati positivi alla ricerca di MAP. Risultati analoghi sono stati ottenuti, in uno studio effettuato, sempre in Svizzera, da Corti *et al.* (15), che hanno riscontrato 273 positività (19,7%) su 1384 campioni di latte presi in esame. Grant (32), su un totale di 244 campioni di latte di massa nel Regno Unito, ha riscontrato la presenza di MAP nel 7,8% dei campioni, mentre Haghkhah (37) ha rinvenuto la presenza di MAP nell'11% delle 110 aziende controllate in Iran.

Appare importante sottolineare che la valutazione della presenza della contaminazione e la quantificazione di MAP nel latte di massa può fornire informazioni per definire il livello di esposizione umana attraverso il consumo di latte.

EFFICACIA DEI TRATTAMENTI TERMICI

Nella tabella 1 (35) sono riepilogati i risultati di numerosi studi, effettuati negli ultimi 10 anni, relativamente alla resistenza di MAP alla pastorizzazione. La sopravvivenza di un basso numero di MAP dopo la pastorizzazione è stata osservata, fino ad ora, nella maggior parte degli studi riguardanti sia latte contaminato artificialmente (11 studi su 14) che naturalmente contaminato (6 studi su 9). Secondo Grant (35) la causa del mancato isolamento di MAP vitali da latte dopo il trattamento termico, evidenziato in alcuni studi, è da imputare a fattori come la quantità del latte testato, l'applicazione della decontaminazione chimica prima della cultura, che riduce la vitalità dei microrganismi, e il momento in cui sono stati effettuati i test (immediatamente dopo l'applicazione del calore o dopo lo stoccaggio a temperatura di refrigerazione). Secondo altri autori, invece, i risultati ottenuti dagli studi di laboratorio che dimostrano sopravvivenza di MAP alla pastorizzazione non sono rappresentativi rispetto alle caratteristiche che presenta il latte comunemente in commercio, essendo le variabili, come il numero di MAP presenti prima del trattamento termico, i sistemi utilizzati per la pastorizzazione e il volume di latte testato, molto diverse da quelle che si presentano nella pratica (11; 68). La pre-

senza di MAP vitali nel latte pastorizzato è stata rilevata però anche da studi colturali effettuati su latte contaminato naturalmente e trattato termicamente secondo le comuni tecniche commerciali (33). Per questo motivo inizia ad essere accettata la possibilità che MAP possa, occasionalmente, sopravvivere alla pastorizzazione High Temperature-Short Time (HTST). I fattori che favoriscono la sopravvivenza di MAP alla pastorizzazione, ad ogni modo, non sono ancora stati chiariti. Sebbene debba essere presa in considerazione la possibilità che le colture positive possano essere la conseguenza di una pastorizzazione inadeguata o di una contaminazione post-processo del latte, negli studi effettuati alla Queen's University di Belfast tutte le indicazioni fanno ragionevolmente pensare che i MAP isolati ottenuti da latte pastorizzato siano realmente sopravvissuti al trattamento. Infatti, tutti i campioni di latte analizzati sono risultati negativi al test della fosfatasi e la possibilità di una contaminazione post-processo è ritenuta improbabile dagli autori dello studio (33). Il numero di MAP vitali nel latte dopo pastorizzazione HTST è in generale molto basso. Grant (32) ha eseguito una ricerca su latte pastorizzato reperibile in commercio ed ha riscontrato valori di contaminazione pari a 4–20 UFC/50 ml. In questo studio non è stato possibile stabilire quale sia stata la riduzione logaritmica di MAP apportata dal trattamento termico poiché non se ne conosceva la sua concentrazione iniziale. È importante comunque mettere in evidenza che le conseguenze sulla salute pubblica per bassi livelli di MAP eventualmente presenti nel latte di vacca pastorizzato che può venire consumato da individui suscettibili (cioè geneticamente predisposti e/o immunocompromessi) rimangono incerte (35).

Studi effettuati nel Regno Unito dimostrano che, aumentando il tempo di pastorizzazione a 25 secondi a 72°C, si determinerebbe una effettiva inattivazione di un alto numero di MAP inoculati nel latte crudo rispetto a quelli inattivati da un trattamento a 72°C per 15 secondi, che era il limite normativo nel Regno Unito. Come diretto risultato di questi studi la maggior parte degli stabilimenti del settore lattiero caseario nel Regno Unito ha volontariamente modificato i parametri di pastorizzazione e, dalla metà del 1998, ha iniziato a pastorizzare il latte per 25 secondi. Quest'azione è stata intrapresa con la speranza di assicurare una completa inattivazione dei MAP eventualmente presenti nel latte crudo (33).

METODI ANALITICI PER LA RILEVAZIONE DI MAP NEL LATTE

La presenza di MAP può essere messa in evidenza attraverso l'utilizzo di metodi di analisi diretti e/o indiretti.

Metodi indiretti

Il metodo ELISA è stata l'unica procedura sierologica utilizzata per rilevare la presenza di anticorpi nel latte. I risultati ottenuti attraverso il metodo ELISA sono spesso basati su un compromesso tra sensibilità e specificità (26). Permane a tutt'oggi la problematica legata alla cross-reattività tra anticorpi che si può verificare quando gli animali vengono a contatto con micobatteri di altre specie. Il vantaggio maggiore di questo metodo è rappresentato dal costo relativamente basso e dalla sua rapidità. Il maggior svantaggio è invece rappresentato dal fatto che alla presenza di MAP nel latte non corrisponde necessariamente la presenza di anticorpi (64).

Metodi diretti

Rilevamento di MAP attraverso l'esame colturale.

Il metodo colturale, su qualunque matrice, è considerato il "gold standard" per il rilevamento di MAP. Sebbene l'uso sia molto diffuso, le tecniche di coltivazione non sono standardizzate e l'abilità dei differenti laboratori varia notevolmente. Un aspetto riconosciuto come critico nei metodi colturali è la preparazione del campione. L'approccio più comune per l'isolamento o la rilevazione di MAP nel latte è basato sulla centrifugazione di una grande quantità di latte e sull'utilizzazione, per la ricerca, del sedimento e/o della crema (7; 53; 59; 76). Dopo la centrifugazione del latte, nel sedimento può essere rinvenuto più del 69,4% delle cellule di MAP, mentre nella crema e nel siero se ne ritrovano, rispettivamente, il 13% e il 17,6% (29).

Le modalità riportate dai differenti autori per la centrifugazione del latte crudo vaccino sono variabili: il volume del latte centrifugato è compreso generalmente tra 40 e 50 ml, ad eccezione di alcuni studi in cui sono riportati valori più bassi (da 1 a 18 ml) o più alti (da 100 a 250 ml). La durata della centrifugazione varia generalmente tra i 15 e i 30 minuti, sebbene siano riportati anche tempi di 10, 20 o anche 60 minuti. La forza di centrifugazione è generalmente inferiore a 9000 g; in rare occasioni sono state usate centrifughe a 14000 e 41000 g.

La decontaminazione dei campioni di latte è un passaggio necessario per l'isolamento di MAP dal latte crudo, ma non è richiesto quando si

analizza latte pastorizzato poiché, in questo caso, la possibilità di crescita di altri microrganismi è molto bassa. I metodi per eliminare selettivamente la flora contaminante sono fattori utili ad assicurare un'alta sensibilità nel rilevamento di MAP. Il latte crudo solitamente contiene un elevato livello di contaminanti e la scelta del passaggio della decontaminazione chimica è importante per recuperare con successo MAP (18).

Il cloruro di cetilpiridino monoidrato (HPC) è la sostanza decontaminante più utilizzata, più conosciuta e meno dannosa per MAP, ma anche la più efficiente per eliminare altri microrganismi. La decontaminazione dura, generalmente, 4 o 5 ore ma può essere prolungata anche per una notte. L'utilizzo di HPC per periodi di tempo eccessivi, a temperature maggiori della temperatura ambiente o in associazione con antibiotici può comportare un decremento dell'effettiva carica di MAP presente nel campione (24).

La coltivazione convenzionale di MAP richiede terreni arricchiti, solidi o liquidi, con aggiunta di Mycobatin J. I terreni solidi comunemente usati sono l'Herrold's Egg Yolk Medium (HEYM), il Lowenstein-Jensen agar (LJ) e il Middlebrook agar. Questi terreni risultano in grado di supportare la crescita di MAP, ma nessuno di questi sembra essere in grado di supportare la crescita di tutti i ceppi. Secondo alcuni autori, per isolare tutti i ceppi si dovrebbero utilizzare i terreni in parallelo (16). L'incubazione avviene a 37°C e le colonie, in alcuni casi, sono visibili dopo 4 settimane, più frequentemente dopo 10 – 16 settimane. È stato gradualmente dimostrato che la sensibilità di questi metodi dipende in larga misura dal modo in cui viene preparato l'inoculo per la semina nel terreno di coltura e dall'assenza di contaminazione del campione (64).

Tra i metodi di coltura liquidi si annoverano il sistema BACTEC e il sistema MGIT. Il sistema BACTEC si basa sulla misurazione radiometrica della CO₂ radioattiva formata dalla metabolizzazione da parte del MAP del carbonio radioattivo fornitogli con il terreno. Il sistema è uno dei metodi di coltura più sensibili, ma è poco usato a causa della necessità di utilizzare materiale radioattivo. Il sistema MGIT utilizza un sistema a fluorescenza che quantifica il consumo o la riduzione dell'O₂ da parte di MAP. Negli ultimi anni è stato adattato alla ricerca di MAP il test FASTPlaqueTB (Biotec Laboratories Limited, Ipswich, UK), basato sull'abilità del micobatteriofago D29 di replicarsi solo all'interno di cellule di *Mycobacterium* spp. vitali e di portare alla lisi delle stesse. Il risultato è visibile tramite la formazione di placche sul mezzo di coltura entro 24-48 ore e viene espres-

so in Unità Formanti Placca (UFP)/ml (60; 23). La sensibilità dimostrata da questo metodo risulta più bassa di 1 o 2 \log_{10} rispetto alla sensibilità della coltura su HEYM (1). Questi metodi richiedono inoltre un'ulteriore conferma attraverso l'uso di una specifica PCR (70).

Metodi di rilevamento mediante Polimerase Chain Reaction (PCR)

Una delle maggiori difficoltà che s'incontrano nel lavorare con MAP è legata alla sua lenta crescita e la sua tendenza a formare aggregati, rendendo problematica la conta delle colonie. Per superare le difficoltà associate ai metodi di coltura tradizionali, alcuni laboratori hanno iniziato ad utilizzare moderne tecniche biomolecolari per individuare la presenza di MAP in diversi substrati (47; 30; 51; 38). La PCR classica, nei lavori presenti in letteratura (27; 41; 76), ha come obiettivo l'amplificazione della sequenza *IS900*. Attualmente la metodica PCR più utilizzata per la ricerca di MAP è la Real Time PCR (64), che presenta numerosi vantaggi rispetto alla PCR classica (59; 63): maggiore sensibilità, elevata specificità, grazie all'uso delle sonde (probes), possibilità di quantificazione, analisi di un maggior numero di campioni, gestione dei dati più facile e più veloce.

La PCR è un metodo rapido e sensibile per l'individuazione di MAP nel latte, della quale sono state descritte diverse varianti. Quasi tutti i protocolli PCR hanno come obiettivo la sequenza *IS900*, che è stata accettata come un marker standard per MAP (64; 15; 40; 71; 25; 52; 59; 62). Tuttavia, l'analisi dei genomi di altre specie di micobatteri ha rivelato che sono presenti sequenze altamente omologhe alla *IS900* di MAP (21). Per dimostrare l'attendibilità dell'individuazione di MAP attraverso la PCR devono quindi essere valutati altri elementi genetici specifici di MAP. Fino ad oggi, come sequenze target alternative, sono stati utilizzati l'elemento *F57*, l'elemento *HspX*, presenti in singola copia nel genoma di MAP, e l'elemento *ISMav2*, presente in tre copie (57; 19; 74, 61). Nello specifico, il primer *hspX* permette di amplificare la porzione di una proteina specifica di MAP, la cui espressione aumenta in caso di shock termico (heat shock-like protein) e per questo motivo può essere utilizzato solamente nella ricerca di MAP nel latte trattato termicamente (20). La sequenza *IS900* è presente nel genoma di MAP in un numero di copie variabile tra 12 e 18 (9; 55). Per questa ragione la ricerca della sequenza *IS900* permette di identificare MAP con una maggior sensibilità rispetto alle metodiche che ricercano sequenze presenti in singola copia come *F57* (57). Il vantaggio della ricerca della sequenza *F57* è rappresentato dalla sua rigorosa unicità in MAP e

dalla capacità di quantificare il numero di MAP presenti tramite la quantificazione del numero di copie presenti nel campione (39; 76). L'individuazione di sequenze diverse da *IS900*, dunque, potrebbe non fornire una sensibilità elevata, ma è meno incline a dare falsi positivi ed è molto più accurata allo scopo della quantificazione. Lo svantaggio dei metodi PCR attualmente utilizzati per l'individuazione di MAP nel latte è dato dal fatto che non è possibile distinguere tra i micobatteri vitali e quelli non vitali presenti nel campione (64).

Per quanto riguarda la sensibilità della PCR, i dati riportati in bibliografia sono molto differenti e difficilmente confrontabili, a causa delle non standardizzate metodiche di trattamento dei campioni. Sharma *et al.* (62) affermano che la sensibilità della metodica PCR, per il latte, è risultata significativamente bassa, definendo, invece, moderatamente sensibile l'ELISA e altamente sensibili le metodiche colturali. Giese e Ahrens (27) riportano che la PCR nel latte crudo di vacca può individuare MAP, ma che il metodo colturale risulta più sensibile. Stabel *et al.* (69) riportano che la PCR è altamente sensibile e specifica per il latte bovino. Altri autori (56) riportano che la ricerca, attraverso la PCR, della sequenza *IS900* è più sensibile dei metodi colturali. Buergelt e Williams (8) affermano che sia il metodo colturale che la PCR *IS900* possono individuare MAP quando è presente alla concentrazione di 10-100 UFC/ml. Millar (46) ha messo a punto una metodica PCR che ha come limite di individuazione 1 microrganismo per reazione con il primer *IS900* e 20 microrganismi per reazione con il primer *HspX*. Slana *et al.* (63) hanno sviluppato una metodica duplex real time qPCR specifica per la ricerca di MAP. Questa metodica amplifica l'elemento *IS900* per le analisi qualitative e la singola copia *F57* per le analisi quantitative. La sensibilità del test, ottenuta tramite una contaminazione sperimentale, risulta essere di 83 cellule di MAP per ml tramite la ricerca di *F57* e di circa 5-6 cellule di MAP per ml tramite la ricerca di *IS900*.

Uno dei principali fattori influenzanti la sensibilità dell'analisi del latte in PCR è sicuramente la preparazione del campione. Grant *et al.* (30) hanno messo a confronto i risultati ottenuti procedendo direttamente con la real time PCR *IS900* con quelli ottenuti facendo precedere alla real time PCR *IS900* una ImmunoMagnetic Separation (IMS). L'IMS è una tecnica che consente la cattura selettiva delle cellule di MAP tramite l'utilizzo di biglie metalliche ricoperte da anticorpi specifici per MAP. La real time PCR diretta è stata in grado di rilevare un minimo di 10^5 UFC/50 ml di latte artificialmente contaminato (circa 2000 UFC/ml), mentre l'IMS-real

time PRC ha rilevato un minimo di 10^3 UFC/50 ml di latte artificialmente contaminato (circa 20 UFC/ml). Stratmann *et al.* (72) hanno messo a punto una Peptide-mediated Magnetic Separation (PMS), tecnica che sfrutta lo stesso principio dell'IMS, utilizzando, al posto degli anticorpi, una miscela 50:50 dei due peptidi *aMp3* e *aMptD*. Dopo la PMS, la real time PCR *ISmav2* ha rilevato una concentrazione di MAP pari a 10^1 UFC/ml di latte artificialmente contaminato. Gao *et al.* (25) hanno preso in esame i fattori che influenzano la rilevazione di MAP dal latte crudo attraverso la PCR e le loro interazioni. Il trattamento termico, l'utilizzo come substrato per l'isolamento di un pool composto dal sedimento e dalla crema e il trattamento attraverso l'HPC migliorano significativamente la rilevazione di MAP attraverso la PCR, mentre invece il lavaggio del sedimento prima dell'estrazione del DNA non ha dato buoni risultati. Il limite di rilevazione, utilizzando questa tecnica ottimizzata, è stato stimato in 15-50 UFC in 50 ml, o ≤ 1 UFC/ml. Rodriguez-Làzaro *et al.* (59) hanno utilizzato la metodica real time PCR per la ricerca di MAP nell'acqua e nel latte. Effettuando la centrifugazione del campione prima dell'amplificazione il test è stato in grado di identificare 10^2 cellule di MAP in 20 ml di acqua contaminata artificialmente. Attraverso un pretrattamento enzimatico e detergente del campione, prima della centrifugazione e dell'estrazione degli acidi nucleici, il test è stato in grado di rilevare costantemente 10^2 MAP in 20 ml di latte parzialmente scremato contaminato artificialmente. Herthnek *et al.* (40) hanno messo a punto una metodica per ricercare MAP nel latte di massa attraverso l'utilizzo della real time PCR. Il sedimento e la crema sono stati riuniti in un pool e sottoposti a digestione enzimatica e distruzione meccanica, infine il DNA è stato estratto mediante automated magnetic bead separation. La sensibilità analitica è stata valutata in 100 organismi per ml di latte che, secondo Herthnek, corrisponde a circa 1-10 UFC/ml, data la tendenza di MAP a formare aggregati.

La possibilità di rilevare la contaminazione da MAP nei prodotti lattiero-caseari è migliorata negli ultimi 30 anni ma, per definire se questa contaminazione possa essere causa dell'insorgenza della malattia nell'uomo, è necessario disporre di test diagnostici sensibili. Le tecniche di coltura sono limitanti a causa dei loro costi e del lungo tempo necessario ad avere i risultati e non possono essere quindi valide ai fini diagnostici. Le tecniche molecolari, basate sulla PCR, stanno diventando uno strumento valido ai fini diagnostici, grazie alla loro rapidità e al loro basso costo. E' comunque necessaria una standardizzazione delle tecniche di prepa-

razione dei campioni al fine di rendere ripetibile la sensibilità analitica della PCR.

CONCLUSIONI

La diffusione della paratubercolosi negli allevamenti di bovini da latte è stimata a livello internazionale tra il 7-55% degli allevamenti. In Europa è stato evidenziato che nel 47% dei campioni di latte di massa sono presenti anticorpi per MAP. Negli studi riguardanti il nostro Paese la prevalenza degli allevamenti infetti si attesta tra il 19,2 e il 76,5%: questa grande variabilità è dovuta ai differenti metodi di campionamento e di rilevazione utilizzati per individuare gli allevamenti positivi.

MAP può essere eliminato da vacche infette attraverso il latte ma le informazioni sull'entità della contaminazione da MAP nel latte sono scarse. Si stima che una vacca che presenta segni clinici di malattia elimini col latte meno di 100 UFC/ml, mentre un animale asintomatico può eliminare 2-8 UFC/50 ml di latte. La presenza di MAP nel latte di massa è dovuta, in larga misura, a contaminazione fecale e la portata della contaminazione fecale del latte, essendo strettamente legata alla quantità di MAP eliminata con le feci e alle condizioni igieniche dell'allevamento, è difficilmente prevedibile. Considerando che potenzialmente l'eliminazione di MAP con le feci può essere elevata, il latte di una singola bovina potrebbe contenere ben oltre le 100 UFC/ml.

Gli studi sulla presenza di MAP nel latte di massa evidenziano i campioni analizzati sono contaminati in percentuali oscillanti tra il 7,8% e il 22,4% e sembra ormai accettata la possibilità che MAP possa, occasionalmente, sopravvivere alla pastorizzazione HTST quando la contaminazione da MAP è elevata ($>10^3$ UFC/ml) mentre la pastorizzazione LTLT sembra più efficace nel ridurre cariche elevate di MAP. I fattori che favoriscono la sopravvivenza di MAP alla pastorizzazione, ad ogni modo, non sono ancora stati chiariti. Le stime sul numero di MAP vitali presenti nel latte in seguito alla pastorizzazione HTST sono in generale molto basse (4-20 UFC/50 ml). L'innalzamento delle temperature di trattamento o il prolungamento oltre i 25 secondi del tempo di trattamento si sono dimostrati efficaci nel ridurre la probabilità di sopravvivenza di MAP. In Italia la pastorizzazione HTST viene solitamente effettuata a temperature di 73-76°C, con 10-20 secondi di sosta termica, e in questo contesto la contaminazione iniziale del latte sottoposto a trattamento risulta fondamentale per la valutazione della probabilità di sopravvivenza del MAP e dell'esposizione umana a questo micobatterio attraverso il consumo di latte trattato termica-

mente. Il metodo colturale, su qualunque matrice, è considerato il “gold standard” per il rilevamento di MAP. Sebbene l’uso sia molto diffuso, le tecniche di coltivazione non sono standardizzate e l’abilità dei differenti laboratori a coltivare varia notevolmente. E’ stato dimostrato che la sensibilità di questi metodi dipende in larga misura dal modo in cui viene preparato l’inoculo per la semina nel terreno di coltura e dall’assenza di contaminazione del campione. L’utilizzo di tecniche biomolecolari può essere un valido aiuto per superare le problematiche tecniche legate alla coltivazione di MAP. L’utilizzo della real time PCR, associata a tecni-

che di concentrazione quali l’IMS, ha permesso di rilevare 10^3 UFC/50 ml di latte artificialmente contaminato (circa 20 UFC/ml). Recentemente l’utilizzo della Peptide-mediated Magnetic Separation (PMS), associata alla real time PCR, ha permesso di rilevare una concentrazione di MAP pari a 10^1 UFC/ml di latte artificialmente contaminato. Le tecniche molecolari, basate sulla PCR, stanno diventando uno strumento valido ai fini diagnostici, grazie alla loro rapidità e il loro basso costo. E’ comunque necessaria una standardizzazione delle tecniche di trattamento dei campioni al fine di rendere ripetibile la sensibilità analitica della PCR.

Tabella 1. Risultati degli studi effettuati al fine di valutare l’inattivazione di MAP in seguito a trattamento termico HTST.

A. Holder test tube method.

Studio	Livello di contaminazione iniziale del latte in UFC/ml	Parametri di tempo e temperatura utilizzati nello studio	Volume di latte pastorizzato analizzato	Applicazione della decontaminazione chimica	Sopravvivenza di MAP
Stabel <i>et al.</i> (1997)	1×10^4 e 1×10^6 /ml	65°C per 30 ‘	200 µl	Si	Si
	1×10^4 e 1×10^6 /ml	72°- 76°C per 30 ‘	200 µl	Si	No

B. Laboratory-scale pasteurizer method

Studio	Livello di contaminazione iniziale del latte in UFC/ml	Parametri di tempo e temperatura utilizzati nello studio	Volume di latte pastorizzato analizzato	Applicazione della decontaminazione chimica	Sopravvivenza di MAP
Stabel <i>et al.</i> (1997)	1×10^4 e 1×10^6 /ml	65°C per 15 “	200 µl	Si	SI
	1×10^4 e 1×10^6 /ml	72°-76°C per 15 “	200 µl	Si	No
Grant <i>et al.</i> (1998)	1×10^2 /ml- 1×10^3 /ml	71.7°C per 15 “	1 o 10 ml	No	Si
	1×10^1 /ml- $1 \times 10^1/50$ ml	71.7°C per 15 “	1 o 10 ml	No	No
Sung e Collins (1998)*	1×10^6 /ml	65°C per 287 “	1,5 ml	No	No
	1×10^6 /ml	71°C per 70 “	1,5 ml	No	No
	1×10^5 /ml	65°C per 239 “	1,5 ml	No	No
	1×10^5 /ml	71°C per 59 “	1,5 ml	No	No
	1×10^4 /ml	65°C per 191 “	1,5 ml	No	No
	1×10^4 /ml	71°C per 47 “	1,5 ml	No	No
	1×10^3 /ml	65°C per 143 “	1,5 ml	No	No
	1×10^2 /ml	65°C per 96 “	1,5 ml	No	No
	1×10^2 /ml	71°C per 23 “	1,5 ml	No	No
	1×10^1 /ml	65°C per 48 “	1,5 ml	No	No
Keswani & Frank (1998)	1×10^5 /ml	63°C for 30 ‘	250 µl	No	No
	1×10^5 /ml	72°C per 15 “	250 µl	No	No
Gao <i>et al.</i> (2002)	1×10^3 - 1×10^7 /ml	63°C per 30 ‘	600 µl	No	No
	1×10^5 - 1×10^7 /ml	72°C per 15 “	600 µl	No	Si
	1×10^3 /ml	72°C per 15 “	600 µl	No	No

*Il tempo del trattamento termico riportato si riferisce al tempo necessario all'inattivazione del 100% delle cellule di MAP presenti nel latte a quella determinata temperatura.

C. Latte contaminato artificialmente e pastorizzato secondo le normali condizioni commerciali

Studio	Livello di contaminazione iniziale del latte in UFC/ml	Parametri di tempo e temperatura utilizzati nello studio	Volume di latte pastorizzato analizzato	Applicazione della decontaminazione chimica	Sopravvivenza di MAP
Pearce et al. (2001)	0.7x10 ³ -16x10 ³ /ml	63° - 69°C per 15"	50 ml	Si	Si
	0.7x10 ³ -16x10 ³ /ml	72°C per 15"	50 ml	Si	No
Hammer et al. (2002)	1x10 ³ -1x10 ⁵ /ml	Da 67°C per 15" a 87°C per 30"	50 o 100 ml	No	Si
	1x10 ³ -1x10 ⁵ /ml	87°C per 45 e 60 " e 90°C per 15 "	50 o 100 ml	No	No
	1x10 ³ -1x10 ⁵ /ml	90°C per 30, 45 e 60 "	50 o 100 ml	No	Si
McDonald et al. (2005)	1x10 ³ -1x10 ⁴ /ml	72°C per 15 "	1500 ml	Si	Si
	1x10 ³ -1x10 ⁴ /ml	75°C per 25 "	1500 ml	Si	Si
	1x10 ³ -1x10 ⁴ /ml	78°C per 15 "	1500 ml	Si	Si
	1x10 ³ -1x10 ⁴ /ml	72° per 20 e 25 "	1500 ml	Si	No
	1x10 ³ -1x10 ⁴ /ml	75°C per 15 e 20 "	1500 ml	Si	No
	1x10 ³ -1x10 ⁴ /ml	78°C per 20 e 25 "	1500 ml	Si	No
Grant et al. (2005)	1x10 ³ -1x10 ⁵	72,5-74,5-76,5 e 78,5°C per 15 o 25 "	150 ml	No	Si

D. Latte naturalmente contaminato pastorizzato su scala commerciale

Studio	Livello di contaminazione iniziale del latte in UFC/ml	Parametri di tempo e temperatura utilizzati nello studio	Volume di latte pastorizzato analizzato	Applicazione della decontaminazione chimica	Sopravvivenza di MAP
Grant et al. (2002a)	---**	73°C per 15 o 25 "	50 ml	Si	Si
Ayele et al. (2005)	---	71.7°C per 15 "	50 ml	Si	Si

** il livello di contaminazione iniziale non è noto

E. Sorveglianza su latte pastorizzato presente in commercio

Studio	Livello di contaminazione iniziale del latte in UFC/ml	Parametri di tempo e temperatura utilizzati nello studio	Volume di latte pastorizzato analizzato	Applicazione della decontaminazione chimica	Sopravvivenza di MAP
Millar et al. (1996)	---**	---	15 ml	Si	No***
Grant et al. (2002b)	---	72-74°C per 15 "	50 ml	Si	Si
	---	72-75°C per 25 "	50 ml	Si	Si
Gao et al. (2002)	---	---	1 o 5 ml	No	No***
O'Reilly et al. (2004)	---	75°C per 25 "	50 ml	Si	No***
Ellingson et al. (2005)	---	---	50 ml	Si	Si
Cirone et al. (2004)	---	---	50 ml	Si	Si
Ayele et al. (2005)	---	71,7°C per 15 "	50 ml	Si	Si

** il livello di contaminazione iniziale non è noto. *** culture liquide sono risultate positive alla PCR IS900, ma la loro coltura non permesso alcun isolamento

BIBLIOGRAFIA

1. Altic, L.C., Rowe, M.T., Grant, I.R. (2007). UV Light Inactivation of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in Milk as Assessed by FASTPlaqueTB Phage Assay and Culture. *Applied & Environmental Microbiology*, 73(11), 3728-3733
2. Arrigoni N., Belletti G.L., Cammi G., Losini I., Taddei R., Tamba M. (2007). Survey on paratuberculosis prevalence in dairy herds of the Lombardia Region (Italy). *Proceedings of the 9th International Colloquium on Paratuberculosis, Tsukuba, Japan Oct. 29-Nov. 2 2007*
3. Arrigoni, N., Cammi, G., Galletti, G., Losini, I., Taddei, R., Tamba, M., Belletti, G.L. (2007). Bulk milk contamination by *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* and related risk factors. *Proceedings of the 9th International Congress on Paratuberculosis, Tsukuba, Japan Oct. 29-Nov. 2 2007*
4. Autschbach, F., Eisold, S., Hinz, U., Zinser, S., Linnebacher, M., Giese T., Löffler, T., Büchler, M.W., Schmidt, J. (2005). High prevalence of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* IS900 DNA in gut tissues from individuals with Crohn's disease. *Gut*, 54(7), 944-949
5. Beaudeau, F., Belliard, M., Joly, A., Seegers, H. (2007). Reduction in milk yield associated with *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* (Map) infection in dairy cows. *Veterinary Research*, 38, 625-634
6. Benedictus, G., Dijkhuizen, A.A., Stelwagen, J. (1987). Economic losses due to paratuberculosis in dairy cattle. *Veterinary Record*, 121, 142-146
7. Bosshard, C., Stephan, R., Tasara, T. (2006). Application of an F57 sequence-based realtime PCR assay for *Mycobacterium paratuberculosis* detection in bulk tank raw milk and slaughtered healthy dairy cows. *Journal of Food Protection*, 69, 1662-1667
8. Buergelt, C.D., Williams, J.E. (2004). Nested PCR on blood and milk for the detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* DNA in clinical and subclinical bovine paratuberculosis. *Australian Veterinary Journal*, 82, 497-503
9. Bull, T.J., Hermon-Taylor, J., Pavlik, I., El Zaatari, F., Tizard, M. (2000). Characterization of IS900 loci in *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* and development of multiplex PCR typing. *Microbiology*, 146, 2185-2197
10. Bull, T.J., McMinn, E.J., Sidi-Boumedine K., Skull, A., Durkin, D., Neild, P., Rhodes, G., Pickup, R., Hermon-Taylor, J. (2003). 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(7), 2915-23
11. Cerf, O., Griffiths, M.W. (2000). *Mycobacterium paratuberculosis* heat resistance. *Letters in Applied Microbiology*, 30, 341-344
12. Chacon, O., Bermudez, L.E., Barletta, R.G. (2004). Johne's disease, inflammatory bowel disease, and *Mycobacterium paratuberculosis*. *Annual Review of Microbiology*. 58, 329-63
13. Chiodini, R.J. (1989). Crohn's disease and mycobacteriosis: a review and comparison of two disease entities. *Clinical Microbiology Reviews*, 2, 90-117
14. Chi, J., Van Leeuwen, J.A., Wentink, A., Keefe, G.P. (2002). Direct production losses and treatment costs from bovine viral diarrhoea virus, bovine leukosis virus, *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* and *Neospora caninum*. *Preventive Veterinary Medicine*, 55, 137-153
15. Corti, S., Stephan, R. (2002). Detection of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* specific IS900 insertion sequences in bulk-tank milk samples obtained from different regions throughout Switzerland. *BMC Microbiology*, 2, 15
16. De Juan, L., Alvarez, J., Romero, B., Bezos, J., Castellanos, E., Aranaz, A., Mateos, A., Domínguez, L. (2006). Comparison of four different culture media for isolation and growth of type II and type I/III *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* strains isolated from cattle and goats. *Applied & Environmental Microbiology*, 72, 5927-5932
17. Doyle, T.M. (1954). Isolation of Johne's bacilli from the udders of clinically affected cows. *British Veterinary Journal*, 110, 218
18. Dundee, L., Grant, I.R., Ball, H.J., Rowe, M.T. (2001). Comparative evaluation of four decontamination protocols for the isolation of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* from milk. *Letters in Applied Microbiology*, 33, 173-177
19. Ellingson, J.L., Bolin, C.A., Stabe, J.R. (1998). Identification of a gene unique to *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* and application to diagnosis of paratuberculosis. *Molecular and Cellular Probes*, 12, 133-142
20. Ellingson, J.L., Anderson, J., Koziczowski, J., Padcliff, R., Sloan, S., Allen, S., Sullivan,

- N. (2005) Detection of viable *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in retail pasteurized whole milk by two culture methods and PCR. *Journal of Food Protection*, 68(5), 766–972
21. Englund, S., Bolske, G., Johansson, K.E. (2002). An IS900-like sequence found in a *Mycobacterium* sp. other than *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. *FEMS Microbiology Letters*, 209, 267–271
 22. European Commission Directorate-General Health & Consumer Protection (2000). Possible links between Crohn's disease and Paratuberculosis. *Report of the Scientific Committee on Animal Health and Animal Welfare Adopted 21 March 2000*
 23. Foddai, A., Elliott, C.T., Grant, I.R. (2009). Optimization of a phage amplification assay to permit accurate enumeration of viable *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* cells. *Applied & Environmental Microbiology*, 75, 3896–3902
 24. Gao, A., Odumeru, J., Raymond, M., Mutharia, L. (2005). Development of improved method for isolation of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* from bulk tank milk: effect of age of milk, centrifugation, and decontamination. *Canadian Journal of Veterinary Research*, 69, 81–87
 25. Gao, A., Mutharia, L., Raymond, M., Odumeru, J. (2007). Improved template DNA preparation procedure for detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in milk by PCR. *Journal of Microbiological Methods*, 69, 417–420
 26. Geue, L., Kohler, H., Klawonn, W., Drager, K., Hess, R.G., Conraths, F.J. (2007). The suitability of ELISA for the detection of antibodies against *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* in bulk milk samples from Rhineland - Palatinate (in German). *Berliner and Munchenen Tierarztliche Wochenschrift*, 120, 67–78
 27. Giese, S.B., Ahrens, P. (2000). Detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in milk from clinically affected cows by PCR and culture. *Veterinary Microbiology*, 77, 291–297
 28. Gonda, M.G., Chang, Y.M., Shook, G.E., Collins, M.T., Kirkpatrick, B.W. (2007). Effect of *Mycobacterium paratuberculosis* infection on production, reproduction and health traits in US Holsteins. *Preventive Veterinary Medicine*, 80, 103–119
 - 29.
 30. Grant, I.R., Ball, H.J., Rowe, M.T. (1998). Isolation of *Mycobacterium paratuberculosis* from milk by immunomagnetic separation. *Applied & Environmental Microbiology*, 64, 3153–3158
 31. Grant, I.R., Pope, C., O'Riordan, L., Ball, H., Rowe, M. (2000). Improved detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in milk by immunomagnetic PCR. *Veterinary Microbiology*, 77, 369–378
 32. Grant, I.R., Rowe, M.T. (2001). Methods for detection and enumeration of viable *Mycobacterium paratuberculosis* from milk and milk products. *Bulletin of the International Dairy Federation*, 362, 41–52
 33. Grant, I.R., Ball, B., Rowe, M. (2002). Incidence of *Mycobacterium paratuberculosis* in bulk eaw and commercially pasteurized cows' milk from approved dairy processing establishments in the United Kingdom. *Applied & Environmental Microbiology*, 68, 2428–2435
 34. Grant, I.R., Hitchings, E.I., McCartney, A., Ferguson, F., Rowe, M.T. (2002). Effect of commercial-scale high-temperature, short-time pasteurization on the viability of *Mycobacterium paratuberculosis* in naturally infected cows' milk. *Applied & Environmental Microbiology*, 68(2), 602–607
 35. Grant, I.R., Williams, A.G., Rowe, M.T., Donald Muir, D. (2005). Efficacy of various pasteurization time-temperature conditions in combination with homogenization on inactivation of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in milk. *Applied & Environmental Microbiology*, 71(6), 2853–2861
 36. Grant, I.R. (2006). *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* in foods: current evidence and potential consequences. *International Journal of Dairy Technology*, 59(2), 112–117
 37. Greenstein, R.J., Collins, M.T. (2004). Emerging pathogens: is *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* zoonotic? *Lancet*, 31, 396–397
 38. Haghkhah, M., Ansari-Lari, M., Novin-Baheran, A.M., Bahramy, A. (2008). Herd-level prevalence of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* by bulk-tank milk PCR in Fars province (southern Iran) dairy herds. *Preventive Veterinary Medicine*, 86, 8–13
 39. 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 (7129), 449–453
 40. Herthnek, D., Bolske, G. (2006). New PCR systems to confirm real-time PCR detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. *BMC Microbiology*, 6, 87

41. Herthnek, D., Nielsen, S.S., Lindberg, A., Bölske, G. (2008). A robust method for bacterial lysis and DNA purification to be used with real-time PCR for detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in milk. *Journal of Microbiological Methods*, 75, 335–340
42. Jayarao, B.M., Pillai, S.R., Wolfgang, D.R., Griswold, D.R., Rossiter, C.A., Tewari, D., Burns, C.M., Hutchinson, L.J. (2004): Evaluation of IS900-PCR assay for detection of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* infection in cattle using quarter milk and bulk tank milk samples. *Foodborne Pathogens and Disease*, 1, 17–26
43. Johnson, Y.J., Kaneene, J.B., gardiner, J.C., Lloyd, J.W., Sprecher, D.J., Coe, P.H. (2001). The effect of subclinical *Mycobacterium paratuberculosis* infection on milk production in Michigan dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 84, 2188-2194
44. Liandris, E., Frigerio, M., Luzzago, C., Piccinini, R., Zecconi, A. (2004). Indagine epidemiologica sulla prevalenza di paratuberculosis in allevamenti bovini da latte in un'area pedemontana lombarda. *Atti della Società Italiana di Buiatria*, XXXVI, 131–136
45. Lillini, E., Bitonti, G., Gamberale, F., De Grossi, L., Cersini, A. (2005). A survey on the prevalence of bovine paratuberculosis in roman province. *Proceedings of the 8th International Colloquium on Paratuberculosis, Copenhagen, 14-18 august 2005*
46. Manning, E.J.B., Collins, M.T. (2001). *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*: pathogen, pathogenesis and diagnosis. *Revue scientifique et technique, Office international des épizooties*, 20, 133–150
47. Millar, D., Ford, J., Sanderson, J., Withey, S., Tizard, M., Doran, T., Hermon-Taylor, J. (1996). IS900 PCR to detect *Mycobacterium paratuberculosis* in retail supplies of whole pasteurized cows' milk in England and Wales. *Applied & Environmental Microbiology*, 62, 3446-3452
48. Milner, A.R., Mack, W., Coates, K., Hill, J., Gill, I., Sheldrick, P. (1990). The sensitivity and specificity of a modified ELISA for the diagnosis of Johne's disease from a field trial in cattle. *Veterinary Microbiology*, 25 (2–3), 193–198
49. Nebbia, P., Robino, P., Zoppi, S., De Meneghi, D. (2005). Detection end excretion pattern of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* in milk of asymptomatic sheep and goats by Nested – PCR. *Small ruminant research*, 66, 116–120
50. Nielsen, S.S., Thamsborg, S.M., Houe, H., Bitsch, V. (2000). Bulk-tank milk ELISA antibodies for estimating the prevalence of paratuberculosis in Danish dairy herds. *Preventive Veterinary Medicine*, 44, 1-7
51. Nielsen, S.S., Thamsborg, S.M., Houe, H., Bitsch, V. (2000). Corrigendum to "Bulk-tank milk ELISA antibodies for estimating the prevalence of paratuberculosis in Danish dairy herds". *Preventive Veterinary Medicine*, 46, 297
52. Nielsen, S.S., Houe, H., Thamsborg, S., Bitsch, V. (2001). Comparison of two enzyme-linked immunosorbent assays for serologic diagnosis of paratuberculosis (Johne's disease) in cattle using different subspecies strains of *Mycobacterium avium*. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 13 (2), 164–166
53. O'Mahony, J., Hill, C. (2002). A real time PCR assay for the detection and quantitation of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* using SYBR Green and the Light Cycler. *Journal of Microbiological Methods*, 51, 283–293
54. O'Mahony, J., Hill, C. (2004). Rapid real-time PCR assay for detection and quantitation of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* DNA in artificially contaminated milk. *Applied & Environmental Microbiology*, 70, 4561–4568
55. Ott, S.L., Wells, S.J., Wagner, B.A. (1999). Herd-level economic losses associated with Johne's disease on US dairy operations. *Preventive Veterinary Medicine*, 40, 179–192
56. Pavlik, I., Horvathova, A., Dvorska, L., Bartl, J., Svastova, P., Du Maine, R., Rychlik, I. (1999). Standardisation of restriction fragment length polymorphism analysis for *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis*. *Journal of Microbiological Methods*, 38, 155–167
57. Pillai, S.R., Jayarao, B.M. (2002). Application of IS900 PCR for detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* directly from raw milk. *Journal of Dairy Science*, 85, 1052–1057
58. Poupard, P., Coene, M., Van Heuverswyn, H., Cocito, C. (1993). Preparation of a specific RNA probe for detection of *Mycobacterium paratuberculosis* and diagnosis of Johne's disease. *Journal of Clinical Microbiology*, 31, 1601–1605
59. Robbi, C., Rossi, I., Nardelli, S., Rossi, E., Toson, M., Marangon, S., Vicenzi, G., Vicenzoni, G. (2002). Prevalenza della paratuberculosis (Johne's Disease) nella popolazione di bovine da latte della regione Veneto. *Atti*

- della Società Italiana di Buiatria, XXXIV, 283-288
60. Rodriguez-Lazaro, D., D'Agostino, M., Herrewegh, A., Pla, M., Cook, N., Ikononopoulos, J. (2005). Real-time PCR-based methods for detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in water and milk. *International Journal of Food Microbiology*, 101, 93–104
 61. Rybniker, J., Kramme, S., Small, P.L. (2006). Host range of 14 mycobacteriophages in *Mycobacterium ulcerans* and seven other mycobacteria including *Mycobacterium tuberculosis*—application for identification and susceptibility testing. *Journal of Medical Microbiology*, 55, 37–42
 62. Schonenbrucher, H., Abdulmawjood, A., Failing, K., Bulte, M. (2008). A new triplex real time-PCR-assay for detection of *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* in bovine faeces. *Applied & Environmental Microbiology*, 74, 2751–2758
 63. Sharma, G., Singh, S.V., Sevilla, I., Singh, A.V., Whittington, R.J., Juste, R.A., Kumar, S., Gupta, V.K., Singh, P.K., Sohal, J.S., Vihan, V.S. (2008). Evaluation of indigenous milk ELISA with m-culture and m-PCR for the diagnosis of Bovine Johne's disease (BJD) in lactating Indian dairy cattle. *Research in Veterinary Science*, 84, 30–37
 64. Slana, I., Kralik, P., Kralova, A., Pavlik, I. (2008). On-farm spread of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in raw milk studied by IS900 and F57 competitive real time quantitative PCR and culture examination. *International Journal of Food Microbiology*, 128, 250–257
 65. Slana, I., Paolicchi, F., Janstova, B., Navratilova, P., Pavlik, I. (2008). Detection methods for *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in milk and milk products: a review. *Veterinarni Medicina*, 53(6), 283–306
 66. Smith, H.W. (1960). The examination of milk for the presence of *Mycobacterium Johnei*. *Journal of Pathology & Bacteriology*, 80, 440-442
 67. Stabel, J.R. (1998). Johne's disease: a hidden threat. *Journal of Dairy Science*, 81, 283–288
 68. Stabel, J.R. (2000). Johne's disease and milk: do consumers need to worry? *Journal of Dairy Science*, 83, 1659–1663
 69. Stabel, J.R., Pearce, L., Chandler, R., Hammer, P., Klijn, N., Cerf, O., Collins, M. T., Heggum, C., Murphy, P. (2001). Destruction by heat of *Mycobacterium paratuberculosis* in milk and milk products. *Bulletin of International Dairy Federation*, 362, 53-60
 70. Stabel, J.R., Wells, S.J., Wagner, B.A. (2002). Relationship between fecal culture, ELISA, and bulk tank milk test results for Johne's disease in US dairy herds. *Journal of Dairy Science*, 85, 525-531
 71. Stanley, E.C., Mole, R.J., Smith, R.J., Glenn, S.M., Barer, M.R., McGowan, M., Rees, C.E.D. (2007): Development of a new, combined rapid method using phage and PCR for detection and identification of viable *Mycobacterium paratuberculosis* bacteria within 48 hours. *Applied & Environmental Microbiology*, 73, 1851–1857
 72. Stephan, R., Bohler, K., Corti, S. (2002). Incidence of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* in bulk-tank milk samples from different regions in Switzerland. *Veterinary Record*, 150, 214-215
 73. Stratmann, J., Strommenger, B., Stevenson, K., Gerlach, G.F. (2002). Development of a peptide-mediated capture PCR for detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in milk. *Journal of Clinical Microbiology* 40, 4244-4250
 74. Streeter, R.N., Hoffsis, G.F., Bech-Nielsen, S., Shulaw, W.P., Rings, D.M. (1995). Isolation of *Mycobacterium paratuberculosis* from colostrum and milk of subclinically infected cows. *American Journal of Veterinary Research*, 56, 1322–1324
 75. Strommenger, B., Stevenson, K., Gerlach, G.F. (2001): Isolation and diagnostic potential of ISMav2, a novel insertion sequence-like element from *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis*. *FEMS Microbiology Letters*, 196, 31–37
 76. Sweeney, R.W., Whitlock, R.H., Rosenberger A.E. (1992). *Mycobacterium paratuberculosis* cultured from milk and supramammary lymph nodes of infected asymptomatic cows. *Journal of Clinical Microbiology*, 30, 166-171
 77. Tasara, T., Stephan, R. (2005). Development of an F57 sequence-based real-time PCR assay for detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in milk. *Applied & Environmental Microbiology*, 71, 5957–5968
 78. Taylor, T.K., Wilks C.R., McQueen, D.S. (1981) Isolation of *Mycobacterium paratuberculosis* from the milk of a cow with Johne's disease. *Veterinary Record*, 109(24), 532-533
 79. USDA (2005). Johne's disease on U.S. dairy operations, 2002. *USDA-APHIS (Animal and Plant Health Inspection Service)-VS, Centers for Epidemiology and Animal Health, National Animal Health Monitoring System, Fort Collins, CO*