

ZONOSI

Monitoraggio della tubercolosi nel cinghiale cacciato in ambiti territoriali definiti dalla Provincia di Arezzo

Dario Deni¹, Giuseppina Brocherel¹, Claudia Eleni¹, Alessandra Di Egidio¹, Tamara Cerci¹, Alessia Franco¹, Alessio Capecci², Fabio Parca³, Giuseppe Delogu³, Gianna Fornai³, Umberto Coresi³, Andrea Soncini³, Sergio Temussi³, Stefania Vangelisti³, Alba Cardo³, Marco Casi³, Giovanni Cardeti³, Giampietro Mori³, Ettore Barneschi³, Antonio Battisti¹

¹ Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Regioni Lazio e Toscana

² Provincia di Arezzo - Ufficio Caccia e Pesca

³ ASL 8, Arezzo Sanità Animale

La provincia di Arezzo ha acquisito lo *status* di provincia ufficialmente indenne da tubercolosi bovina nel 2008, e pertanto è compito dei Servizi veterinari, oltre alle competenze sanitarie di legge, accertare possibili cause residue di infezione e di rischio di propagazione della malattia. La tubercolosi bovina è sostenuta da *Mycobacterium bovis* (o da *M. caprae*, altrove indicato anche come *M. bovis* subsp. *caprae*), classificati nel *Mycobacterium tuberculosis complex*, che include anche *M. tuberculosis*, *M. africanum*, *M. canettii*, *M. microti* e *M. pinnipedii*. La trasmissione al bovino e la conseguente introduzione in allevamenti indenni può avvenire attraverso la compravendita di animali infetti, il *carriage* da parte del personale presente in allevamento, l'utilizzo di mezzi di

trasporto non adeguatamente disinfettati o il contatto con animali selvatici infetti. Il ruolo di *reservoir* delle specie





selvatiche e del cinghiale in particolare, è ancora oggetto di studio e approfondimento; tuttavia il cinghiale può essere utilizzato come specie sentinella, indicatore della circolazione di micobatteri nel territorio e pertanto studi trasversali possono risultare utili nell'ambito delle azioni di monitoraggio e sorveglianza della malattia nelle specie *target*.

In Italia, la presenza di agenti del genere *Mycobacterium* e di *M. tuberculosis*-complex, incluso *M. bovis*, sono state segnalate in varie aree della penisola e nelle isole [6, 2, 9, 20].

Il cinghiale, analogamente al suino, è suscettibile all'infezione da varie specie di *Mycobacterium* spp. incluse quelle ascrivibili al *M. tuberculosis*-complex, e al *M. avium*-complex.

La via digerente è considerata la principale via di trasmissione nei suidi, ma le probabilità di rinvenire lesioni sono maggiori nell'ambito della testa e in particolare nei linfonodi connessi (parotidei, sottomandibolari, retrofaringei) [11, 10, 18, 14] oltre che nelle tonsille.

Frequentemente il rinvenimento di lesioni sospette nei distretti sopracitati non è confermato dall'esame istologico e persino lesioni istologicamente compatibili con infezioni da *Mycobacterium* possono non esitare l'isolamento dell'agente eziologico [3, 7, 16].

Le discrepanze nella conferma dell'infezione tubercolare sono ampiamente riportate in letteratura anche nel suino [15, 23, 13, 12, 22, 4]; queste sono perlopiù spiegabili dal fatto che l'agente eziologico non è più vitale nelle lesioni osservate, soprattutto nei linfonodi tributari della regione della testa.

Inoltre, il rinvenimento di micobatteri non appartenenti al gruppo *M. tuberculosis*-complex o *M. avium*-complex è di gran lunga più frequente e quindi sarebbe più corretto utilizzare il termine micobatteriosi in sostituzione di tubercolosi [5].

L'elevato contenuto lipidico della parete conferisce ai micobatteri delle caratteristiche peculiari, tra cui elevata idrofobicità e impermeabilità, resistenza ai comuni disinfettanti e la c.d. alcool-acido resistenza, sfruttata nella colorazione differenziale di Ziehl-Neelsen. La sopravvivenza di *M. bovis* nei pascoli o nei terreni, se localizzato in profondità, raggiunge i due anni [24], per cui il grufolamento, tipico del cinghiale, può favorirne il contatto [1, 6].

Nella provincia di Arezzo, per la notevole diffusione del cinghiale e per la possibile interazione con i ruminanti domestici in aree vocate e dedicate al pascolo bovino, si è deciso di procedere a un monitoraggio nei cinghiali cacciati.

Questo studio preliminare è stato intrapreso per valutare la presenza e stimare l'eventuale prevalenza di infezioni da micobatteri, con particolare attenzione alla circolazione di agenti appartenenti a *M. tuberculosis*-complex, anche a seguito del rischio di trasmissione dell'infezione al bovino attraverso l'ambiente, al fine di implementare

gli strumenti disponibili per mantenere la qualifica di provincia ufficialmente indenne nel tempo.

Materiali e metodi

Lo studio si è svolto grazie alla collaborazione di: ATC 1 (Casentino), ATC 2 (Valtiberina), ATC 3 (Alpe di Poti-Arezzo), Amministrazione Provinciale Ufficio Caccia e Pesca, Servizi Veterinari ASL8 (UFSP Veterinaria Aretina, Valtiberina e Casentino), Istituto Zooprofilattico Sperimentale Lazio e Toscana (IZSLT) Sezione di Arezzo e Strutture della Sede Centrale di Roma (Accettazione Centralizzata - Anatomo-Istopatologia, e Direzione Operativa Diagnostica Generale).

Il monitoraggio è avvenuto nel periodo dicembre 2010-gennaio 2011, per un totale di 2 mesi e ha interessato le vallate della dorsale appenninica Casentino e Valtiberina (figura 1), dove si concentra il 70% del patrimonio bovino della provincia, e la zona montuosa Alpe di Poti, alle porte del comune di Arezzo, zone territoriali con elevata

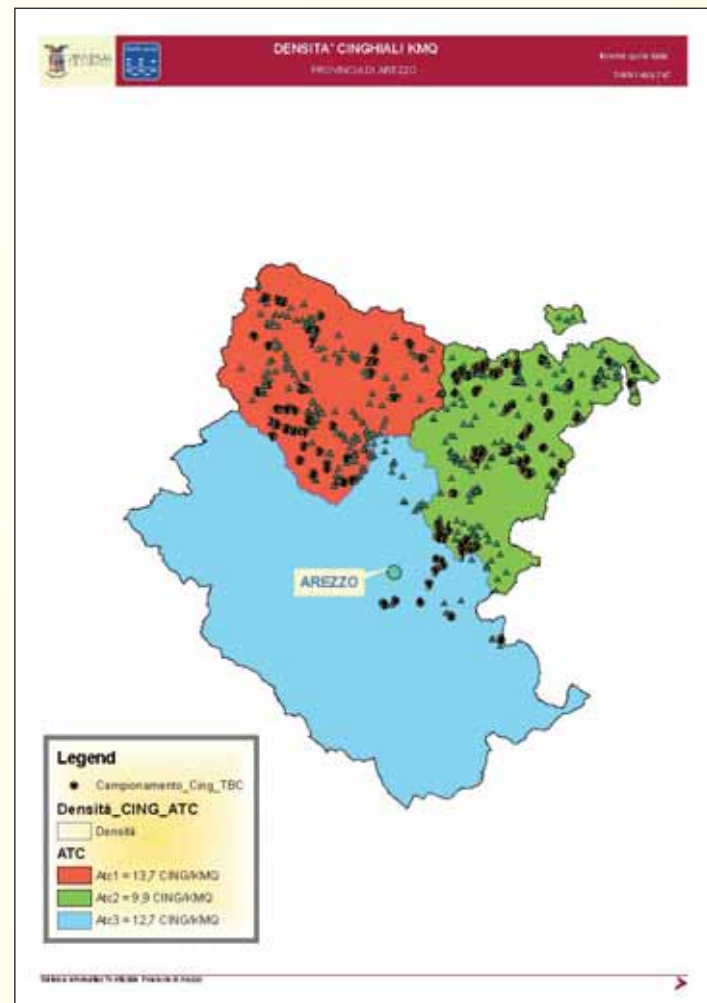


Figura 1. Zona pilota nella provincia di Arezzo.

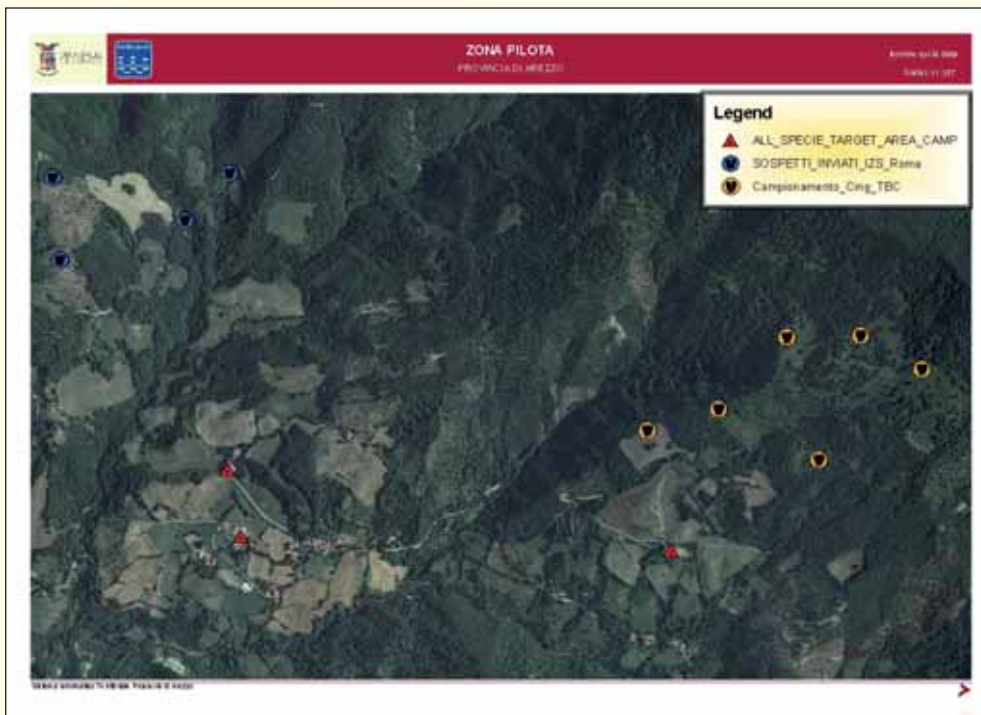


Figura 2. Collocazione geografica dell'area di campionamento, nella Provincia di Arezzo.

coabitazione di bovini allevati al pascolo e cinghiali (figura 2).

La popolazione di cinghiali, nelle aree oggetto di studio, si stima avere consistenza numerica di circa 10.000 animali (stima Ufficio caccia Provincia) (figura 3). Il campionamento si è posto l'obiettivo di individuare la presenza o l'assenza della condizione morbosa (presenza di lesioni di sospetta eziologia da *Mycobacterium* spp.) in termini qualitativi, nei cinghiali abbattuti nel corso di una stagione venatoria.

La dimensione del campione primario è stata valutata in modo da essere adeguata a rilevare l'evento oggetto di studio, ovvero rilevare almeno un animale con lesioni sospette all'esame anatomico-patologico, con un livello di confidenza del 95%, e un livello minimo di prevalenza dell'1,5% (n=200), nelle condizioni teoriche di massima sensibilità applicate ai test diagnostici.

Nelle fasi preliminari sono state individuate le squadre di caccia afferenti alle zone interessate e informate sulle tecniche adeguate per la manipolazione e isolamento della testa, oltre al prelievo del polmone. Questi sono stati consegnati al Servizio veterinario di zona per il prelievo delle tonsille e linfonodi tributari (retrofaringei, sottomandibolari, parotidei, mediastinici, tracheobronchiali).

I campioni prelevati sono stati recapitati alla sezione di Arezzo dell'IZSLT, con relativa modulistica, riportante classe di età, sesso e coordinate per la georeferenziazione dei siti di abbattimento.

Ciascun campione pervenuto è stato sottoposto ad esame anatomopatologico: esame visivo esterno e interno, inci-

sione, palpazione, per verificare la presenza di granulomi e/o alterazioni morfologiche.

I campioni considerati dubbi, per la presenza di lesioni macroscopiche, alterazioni della consistenza, del colore e/o della trama strutturale, sono stati sottoposti immediatamente a colorazione per bacilli alcool-acido resistenti (colorazione di Ziehl-Neelsen).

L'esame istologico e gli accertamenti colturali e molecolari sono stati effettuati solo su campioni sospetti che necessitavano di ulteriori approfondimenti diagnostici.

Esame colturale

L'esame colturale è stato eseguito secondo metodiche di consenso internazionale (OIE, 2011). Le porzioni di linfonodi, sminuzzate e curettate di eventuali residui di

tessuto connettivale o adiposo, sono state omogeneizzate con l'aggiunta di soluzione fisiologica sterile (10-20% P/V); è seguita fase di decontaminazione (soluzione NaOH 2%) e successiva neutralizzazione.

L'omogenato così trattato è stato inoculato in terreni di coltura specifici, Lowenstein-Jensen e Coletsos-Ossein e in terreno liquido Middlebrook 7H9 con aggiunta di piruvato di sodio 1%. Le colture sono state esaminate dopo 2-5 gg e, in seguito, settimanalmente per 12 settimane. Le colture liquide sono state sottoposte ad esame microscopico e *Polymerase Chain Reaction* (PCR) per *Mycobacterium* spp. ad intervalli di 2 settimane, fino al termine del periodo di incubazione.

In presenza di colonie sospette il protocollo prevede di procedere a colorazione del preparato e osservazione al microscopio ottico dei batteri riferibili a *Mycobacterium* spp.

L'identificazione di *Mycobacterium* spp. e delle specie di interesse medico-veterinario avviene attraverso saggio in PCR secondo metodiche di consenso internazionale e in accordo con quanto proposto dal Centro di Referenza Nazionale per la Tuberculosis da *M. bovis* (IZS Lombardia ed Emilia-Romagna, Sede di Brescia).

Esame istologico

Porzioni rappresentative di linfonodi sono state fissate in formalina tamponata al 10%, incluse in paraffina, sezionate a 4 µm e colorate con ematossilina-eosina per l'os-

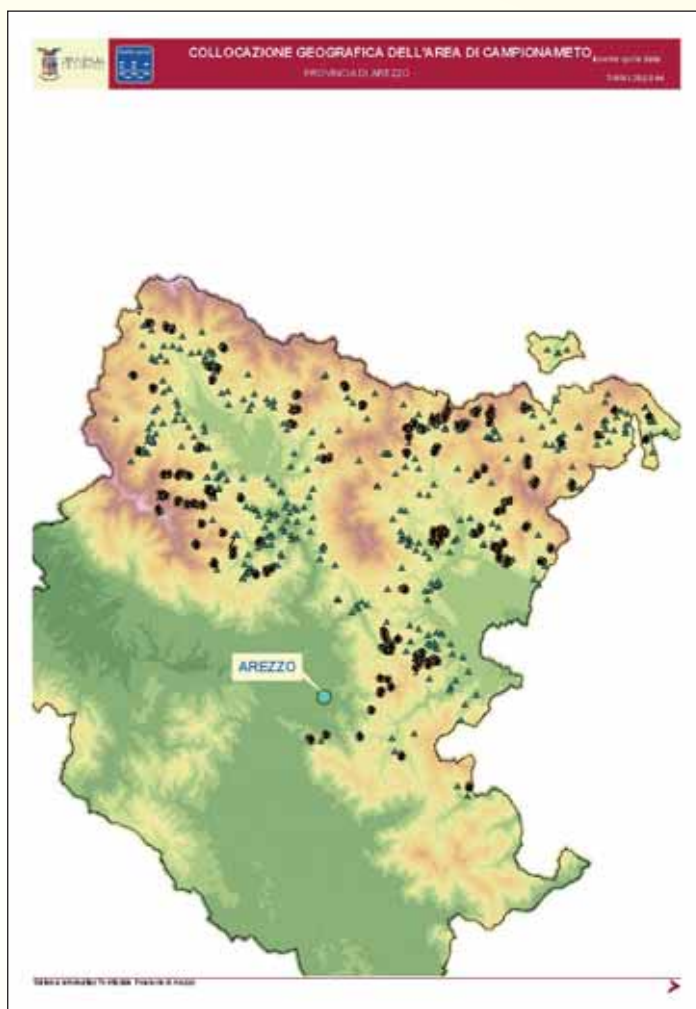


Figura 3. Densità cinghiali per km², nella Provincia di Arezzo.

servazione al microscopio ottico. I preparati istologici che evidenziavano lesioni granulomatose, sono stati successivamente sottoposti alla colorazione di Ziehl-Neelsen per la ricerca di bacilli alcool-acido resistenti.

Risultati

Sono stati recapitati all'IZSLT (Sezione di Arezzo) complessivamente 870 campioni provenienti da 200 cinghiali abbattuti: 376 linfonodi sottomandibolari, 230 linfonodi retrofaringei, 166 linfonodi parotidei, 10 linfonodi mediastinici, 26 linfonodi tracheobronchiali e 62 tonsille.

• Esame anatomopatologico linfonodi e tonsille

L'esame anatomopatologico ha riscontrato 47 campioni dubbi, provenienti da 23 soggetti: 21 campioni presenza di linfoadenomegalia (con evidente aumento di volume); 21 consistenza lardacea al taglio oppure edematosi e congesti; 6 campioni presenza di stato reattivo di espresio-

ne aspecifica (con attenuazione del disegno cortico-midollare); in 10 campioni focolai di necrosi caseosa, a stratificazione concentrica "a cipolla"; 10 campioni focolai diffusi di materiale denso grumoso, di colore giallo o bianco, riconducibile a linfoadenite purulenta. Tutti i 47 campioni dubbi sono risultati negativi alla colorazione Ziehl-Neelsen da impronta e striscio di organo. L'esame anatomico-patologico delle tonsille non ha evidenziato presenza di lesioni.

• Esame Istologico linfonodi e tonsille

L'esame istologico effettuato in 16 campioni, ha evidenziato, in 2 di questi, lesioni riferibili ad actinogranulomatosi e in 1 campione (linfonodo sottomandibolare) lesioni compatibili con presenza di *Mycobacterium* spp. (microfocolai granulomatosi con cellule epitelioidi e cellule giganti di Langhans).

• Esame colturale linfonodi

Tutti i 33 campioni sottoposti ad esame colturale sono risultati negativi per *Mycobacterium* spp.

Discussione

Lo studio pilota rappresenta la prima *survey* sul territorio della provincia di Arezzo con lo scopo di investigare la presenza ed eventualmente stimare la prevalenza di cinghiali affetti da micobatteriosi e in particolare se sostenute da agenti di *M. tuberculosis*-complex. Lo studio è stato condotto con risorse necessariamente limitate, ma comunque ha fornito indicazioni preliminari importanti per l'area oggetto di studio, anche in funzione di azioni future di sorveglianza. Ciò è stato possibile grazie anche all'utilizzo delle prove anatomico-patologiche, microscopiche differenziali, istologiche, colturali con la strategia dei test diagnostici "in serie". Infatti, ogni linfonodo con reperto anatomico-patologico dubbio è stato sottoposto ad esame microscopico per impronta e colorazione per bacilli alcool-acido resistenti, con esito costantemente negativo.

Per quanto, un solo linfonodo di un solo animale, inviato per l'esame istologico, abbia presentato microgranuloma con possibile presenza di *Mycobacterium* spp., a questo non è seguito alcun isolamento, né evidenza di positività a prove di PCR da coltura di arricchimento. Recenti osservazioni in popolazioni di cinghiali a vita libera nell'area mediterranea stimano, per infezioni da *M. tuberculosis*-complex, la Sensibilità Diagnostica (DSE) dell'esame anatomico-patologico al 72,9%, e una DSE complessiva del primo associato all'esame microscopico per bacilli alcool-acido resistenti del 94,4% [21]. È da notare che, contrariamente a quanto comunemente si potrebbe credere, approcci di diagnostica molecolare diretta sui campioni linfonodali possono avere caratteristiche di

performance molto differenti, in rapporto ai protocolli e alla tecnologia utilizzati, ai target molecolari e al contesto di popolazione cui sono applicati, e ciò similmente a quanto accade per altri tipi di prove diagnostiche. Ad esempio, nello stesso studio sopra citato, la prova di PCR diretta (target MPB70 gene) ha esitato una sensibilità addirittura inferiore all'esame anatomo-patologico (DSE=66,7%).

In termini quantitativi l'assenza di evidenza di infezione da *M. tuberculosis*-complex da un campione di 200 animali esaminati, anche soltanto con il singolo esame anatomo-patologico (ovvero non seguito da ulteriori accertamenti di laboratorio), permetterebbe di escluderne (con il 95% di CL e stante la DSE del 72,9%) la presenza nella popolazione di cinghiali dell'area a una prevalenza superiore al 2%. Probabilmente lo *status* della popolazione oggetto di studio nella provincia di Arezzo potrebbe essere stimato anche a prevalenze inferiori, considerando che osservazioni macroscopiche di reattività linfonodale sono state comunque approfondite con esami microscopici, istopatologici, colturali e molecolari.

Queste considerazioni statistiche applicate alla valutazione epidemiologica, hanno implicazioni utili anche alla gestione della sorveglianza. In particolare si ritengono utili allorché si intenda disporre di informazioni di base su un territorio a *status* ignoto nella popolazione di cinghiali (o comunque di ungulati), specialmente per avere valutazioni del rischio di introduzione di tubercolosi nelle specie zootecniche oggetto di Piani di eradicazione in Italia (tubercolosi bovina e bufalina).

Naturalmente, i limiti dello studio in questione risiedono anche nella dimensione del campione e nella sensibilità diagnostica complessiva che si è scelto di privilegiare, utilizzando le prove di laboratorio nel modo sopra ricordato. Di certo, aumentando la dimensione del campione e utilizzando "in parallelo" almeno anche l'esame microscopico di impronta per bacilli alcool-acido resistenti, si aumenterebbe ulteriormente la sensibilità complessiva del sistema. Ulteriore aumento di sensibilità, fino all'approssimazione del 100%, si otterrebbe qualora si volessero utilizzare in parallelo altre (o tutte) prove di laboratorio disponibili. Questo ultimo approccio ad ogni modo è particolarmente dispendioso per l'impegno di ulteriori risorse umane, strumentali e di materiali di consumo che, specialmente per uno studio di popolazione preliminare, non sempre trovano una giustificazione in rapporto all'obiettivo di Sanità Pubblica Veterinaria. È noto infatti che, anche nel caso in cui alcune popolazioni di cinghiali possano essere considerate verosimilmente ospite di mantenimento di *M. tuberculosis*-complex (es. in alcune aree mediterranee in Spagna), esse lo rappresentano soltanto in particolari condizioni ecologiche, gestionali, di densità della specie sul territorio e di livelli elevati di prevalenza [17]. Ulteriore possibile differenza nella probabilità e nella quantità di eliminazione nell'ambiente dell'a-

gente patogeno da parte dei suidi potrebbe variare in rapporto ad infezioni da specie batteriche diverse all'interno del *M. tuberculosis*-complex [8]. In ogni caso, per scopi pragmatici, anche escludere che agenti della tubercolosi e specialmente *M. bovis* circolino in una popolazione di cinghiali a prevalenze superiori all'1-2% con approcci di prove diagnostiche "in serie", rappresenta una buona soluzione di costi/effettività, e dovrebbe essere considerata come opzione d'interesse in rapporto al budget disponibile e di conseguenza valutata anche da decisori di politica sanitaria, anche a livello locale. A questo proposito, è necessario ricordare che *M. bovis* è agente di malattia associato principalmente alla specie bovina, che quindi deve essere considerata come la specie target naturale. Pertanto, a prevalenze molto basse (e valutando anche il relativo 95% CI o escludendone la presenza a tali livelli di prevalenza), è molto ragionevole concludere che le popolazioni di cinghiali a vita libera rappresentino ospite accidentale piuttosto che ospite di mantenimento dell'infezione e che quindi possano non costituire, al momento dell'indagine, un rischio tale per gli allevamenti bovini che necessiti di interventi di Sanità Pubblica Veterinaria, in rapporto alla specifica situazione epidemiologica dell'area.

Il monitoraggio attraverso *surveys* periodiche, infine, realizzate con un approccio simile a quello dello studio pilota nella provincia di Arezzo e supportato da azioni di sorveglianza passiva, è sicuramente raccomandabile per una rivalutazione nel tempo della situazione inizialmente osservata, in funzione di gestione del rischio.

Ringraziamenti

Il lavoro è stato svolto grazie alla collaborazione dei componenti delle squadre di caccia dei territori ATC1, ATC2 e ATC3.

Bibliografia

1. Briedermann L. Schwarzwild. Neumann- Neudamm ed. Berlin. 1986: 539.
2. Coccollone A, Aloï D, Canu G, Lollai S, Ponti N, Patta C, Rolesu S. La Tubercolosi in Sardegna: risultati preliminari del controllo nel cinghiale in un'area problema, 2010. (Atti del Seminario e workshop "Gestione sanitaria della fauna e sanità pubblica esperienze a confronto 2010).
3. Corner LA, Barrett RH, Lepper AWD, Lewis V, Pearson CW. A survey of mycobacteriosis of feral pigs in the Northern Territory. Australian Veterinary Journal. 1981; 57: 537-542.
4. Dey B.P. Mycobacterioses in swine and their significance to public health. United States. 1986. Department of Agriculture Bibliographies and Literature of Agriculture 49, pp.92.
5. Dey BP, Parham GL. Incidence and economics of tuberculosis in swine slaughtered from 1976 to 1988. Journal of the American Veterinary Medical Association. 1993; 203: 516-519.



6. Dini V, Ferroglio E, Serraino A, Mignone W, Sanguinetti V, Bollo E, Rossi L. Epidemiologia delle micobatteriosi nel cinghiale in Liguria. *J. Mt. Ecol.* 2003; 7 (Suppl.): 145-153.
7. Essey MA, Stallknecht DE, Himes EM, Harris SK. Follow-up survey of feral swine for *Mycobacterium bovis* infection on the Hawaiian island of Molokai. Proceedings of the U.S. Animal Health Association Meeting. 1983; 87: 589-595.
8. García-Jiménez WL, Benítez-Medina JM, Fernández-Llario P, Abecia JA, García-Sánchez A, Martínez R, Risco D, Ortiz-Peláez A, Salguero FJ, Smith NH, Gómez L, Hermoso De Mendoza J, 2012. Comparative Pathology of the Natural infections by *Mycobacterium bovis* and by *Mycobacterium caprae* in Wild Boar (*Sus scrofa*). *Transbound Emerg Dis.* 2012 Apr 2. doi: 10.1111/j.1865-1682.2012.01321.x. [Epub ahead of print].
9. Gavaudan S, Bartolini C, Crotti S, Decurtis M, Duranti A, Mancini P, Cagiola M, Barboni CR, Micci E, Fisichella S, Mattozzi C, Fogliani A. Tuberculosis in wild boar in Marche region, Italy: cases report. VIIIth Conference of the European Wildlife Disease Association 27-30 September 2006, Aosta, Italy.
10. Griffin JM, Buchan GS. Aetiology, pathogenesis and diagnosis of *Mycobacterium bovis* in deer. *Veterinary Microbiology.* 1994; 40: 193-205.
11. Itoh R, Kagabu Y, ITOH F. *Mycobacterium bovis* Infection in a Herd of Japanese Shika Deer (*Cervus nippon*). *Journal of Veterinary Medical Science.* 1992; 54: 803-804.
12. Kleeberg HH, NEL EE. Porcine mycobacterial lymphadenitis. *Journal of the South African Veterinary Medical Association.* 1969 40: 233-250.
13. Lesslie IW, Birn KJ, Stuart P, O'Neill PAF, SMITH J. Tuberculosis in the pig and the tuberculin test. *The Veterinary Record.* 1968; 83: 647-651.
14. Lugton IW, Wobeser G, Morris RS, Caley P. Epidemiology of *Mycobacterium bovis* infection in feral ferrets (*Mustela furo*) in New Zealand: I. Pathology and diagnosis. *New Zealand Veterinary Journal.* 1997; 45: 140-150.
15. Luke D. Tuberculosis in the horse, pig, sheep and goat. *The Veterinary Record.* 1958; 70: 529-536.
16. McInerney J, Small KJ, CALEY P. Prevalence of *Mycobacterium bovis* infection in feral pigs in the Northern Territory Australian Veterinary Journal. 1995; 72: 448-451.
17. Naranjo V, Gortazar C, Vicente J, De La Fuente J. Evidence of the role of European wild boar as a reservoir of *Mycobacterium tuberculosis complex*. *Vet Microbiol.* 2008; 5: 127(1-2), 1-9.
18. Nolan A, Wilesmith JW. Tuberculosis in badgers (*Meles meles*). *Veterinary Microbiology.* 1994; 40: 179-191.
19. Office International des Epizooties (OIE). Bovine Tuberculosis. Manual of Standards for Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals. 2011 web format, http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/2.04.07_BOVINE_TB.pdf (accessed 11 January 2012).
20. Pacciarini ML, Boniotti MB, Tagliabue S, Zanoni M, Sala G, Monaci C, Gaffuri A. Detection and genotyping of *Mycobacterium tuberculosis complex* in lymph nodes of wild boar (*Sus scrofa*) populations in Lombardy Region, VII Conference of the European Wildlife Disease Association (EWDA), 27-30 September 2006, Aosta, Italy.
21. Santos N, Galdes M, Afonso A, Almeida V, Correia-Neves M. Diagnosis of tuberculosis in the wild boar (*Sus scrofa*): a comparison of methods applicable to hunter-harvested animals. *PLoS One.* 2010; 10: 5(9). pii: e12.663.
22. Thoen CO, Jarnagin JL, Richards WD. Isolation and identification of Mycobacteria from porcine tissues: a three-year summary. *American Journal of Veterinary Research.* 1975; 36: 1383-1386.
23. Vasenius H. Tuberculosis-like lesions in slaughter swine in Finland. *Nordisk veterinærmedicin.* 1965; 17: 17-21.
24. Wray C. Survival and spread of pathogenic bacteria of veterinary importance within the environment. *Commonwealth Bureau of Animal Health.* 1975; 45: 543-550.