La tubercolosi bovina in Italia (1995-2000)
*di M.Tamba*

La tubercolosi bovina in Lombardia
*di L. Bonfanti*

Epidemiologia descrittiva e stima dei costi di gestione d'alcuni focolai di tubercolosi bovina nella provincia di Lodi
*di G. Zanardi, V.M. Tranquillo, M. Carazzina*

Diagnosi di tubercolosi bovina: problemi diagnostici e nuove strategie
*di L.M.Pacciarini*

**La tubercolosi bovina in Italia (1995-2000)**

*Distribuzione del patrimonio bovino controllabile*

Il patrimonio bovino controllabile non è distribuito uniformemente sul territorio nazionale: il 44,5% degli allevamenti ed il 59,0% dei capi si trovano nel Nord Italia, mentre il 37,7% degli allevamenti, ma solo il 26,4% dei capi controllabili sono allevati nel Sud (Figura 1). Per quanto riguarda l'andamento della consistenza del patrimonio nel tempo, si è registrata una progressiva diminuzione del numero degli allevamenti (da circa 220.000 nel 1995 a circa 180.000 nel 2000), mentre il numero dei capi è rimasto costante (intorno ai 5 milioni) (Figura 2). Ciò ha portato ad un incremento della consistenza media degli allevamenti, con conseguenti problemi sia per il risanamento di quelli infetti.

*Obiettivi e risultati del piano nazionale d'eradicazione*

L'obiettivo del piano nazionale d'eradicazione (D.Min.San. 15.12.1995, n. 592) è quello di dichiarare l'intero territorio nazionale ufficialmente indenne da TB attraverso la successiva dichiarazione di province e regioni. I requisiti previsti dalla normativa nazionale per dichiarare un territorio ufficialmente indenne da TB si discostano da quelli sanciti dalla normativa comunitaria (Dir. 98/46/CE). Le differenze sono state riassunte in Tabella 1 e si può evidenziare che la normativa comunitaria richiede l'effettiva eradicazione della TB dal territorio, mentre la normativa nazionale si "accontenta" di un risultato non consolidato.

**Tabella 1.** Requisiti previsti dalla normativa comunitaria e nazionale per la dichiarazione di territorio ufficialmente indenne da TB

| REQUISITO SANITARIO | D.M. 592/1995 | Dir 97/12/CE (mod. Dir. 98/46/CE) |
|---|---|---|
| numero di allevamenti sotto controllo | tutti | tutti |
| percentuale d'allevamenti ufficialmente indenni da TB al 31 dicembre | ≥ 99,8% nell'ultimo anno | ≥ 99,9% negli ultimi 6 mesi |
| percentuale annua d'allevamenti infetti da TB | non prevista | < 0,1% negli ultimi anni |

Durante il periodo 1995-1999 la percentuale media degli allevamenti controllati a livello nazionale è stata abbastanza buona (sopra il 80%), anche se con notevoli differenze tra le regioni (Tabella 2).

**Tabella 2.** Percentuale annua di patrimonio controllato in Italia, suddiviso per area geografica

| **AREA** | **1995** | **1996** | **1997** | **1998** | **1999** | **2000** |
|---|---|---|---|---|---|---|
| Nord Ovest | 99,69 | 99,98 | 99,76 | 100,00 | 100,00 | 99,79 |
| Nord Est | 99,87 | 93,68 | 99,60 | 96,59 | 98,04 | 90,04 |
| Trentino A.A* | 0,00 | 100,00 | 0,00 | 82,73 | 0,00 | 17,18 |
| Centro | 91,53 | 90,97 | 93,24 | 93,23 | 97,86 | 66,62 |
| Sud | 71,41 | 80,58 | 75,54 | 78,80 | 79,91 | 79,02 |
| **Italia** | **81,49** | **89,65** | **83,49** | **89,23** | **85,77** | **78,30** |

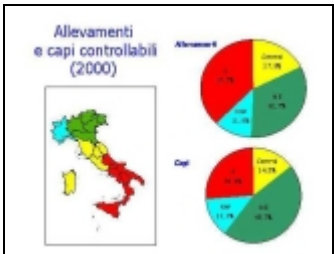
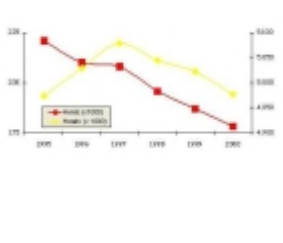
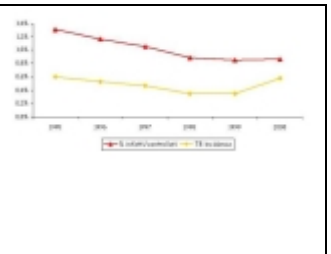
*Escluso Trentino Alto Adige; regione ufficialmente indenne per decisione comunitaria

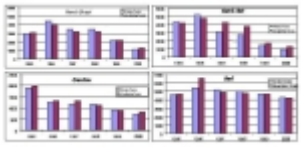
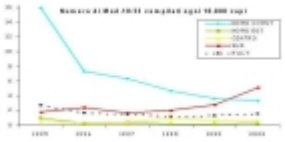
Nel 2000 il numero degli allevamenti controllati è diminuito considerevolmente sia a causa delle emergenze epidemiche che hanno colpito la Sardegna, la Calabria (Blue Tongue) e il Veneto (Influenza Aviaria), sia per il fatto sia alcune regioni ufficialmente indenni avevano sospeso per quell'anno il controllo degli allevamenti (Umbria, province autonome di Trento e di Bolzano). Durante il periodo 1995-2000 la percentuale annua di allevamenti infetti ha mostrato un progressivo diminuzione passando dal 1,1% nel 1995 allo 0,7% nel 2000. Dal confronto tra la situazione rilevata nel 1995 con quella registrata al termine del 2000 (Figura 3) è possibile notare un miglioramento su tutto il territorio nazionale, escluso la Sicilia. In questa Regione, infatti, nel 2000 la percentuale di allevamenti infetti è stata pari al 5,5%. Nel 2000 oltre il 60% degli allevamenti

infetti segnalati in Italia è situato in questa regione. L'andamento della percentuale di allevamenti infetti sui controllati e della percentuale dei focolai di nuova insorgenza (incidenza) sono gradualmente diminuiti a livello nazionale. Il fatto che due indici siano paralleli, indica che nel periodo non si è registrato un significativo diminuzione nei tempi di risanamento dei focolai (Figura 4). Nel periodo considerato il numero di animali risultati positivi alla prova allergica per anno si è progressivamente dimezzato, passando dai 14.048 capi del 1995 ai 7.786 del 2000. Dall'analisi dei dati disponibili risulta che tutti gli animali infetti siano stati macellati (Figura 5). Dagli stessi grafici si può anche evincere che solamente nel Nord-Est si è fatto più frequentemente ricorso allo stamping-out come misura di lotta all'infezione, mentre, soprattutto negli anni scorsi nel Nord-Ovest e nel Sud, il numero degli animali abbattuti per anno è leggermente inferiore a quello degli animali risultati positivi; ciò potrebbe essere indice di qualche ritardo nella macellazione degli animali infetti. Le segnalazioni di lesioni tubercolari su animali presentati alla macellazione ordinaria (Mod. 10/33) sono progressivamente diminuiti. Nel 2000 un aumento delle segnalazioni è stato registrato nel Sud Italia, anche in questo caso il dato risente della situazione siciliana (Figura 6). La percentuale annua di allevamenti ufficialmente indenni da TB a livello nazionale è progressivamente aumentata passando dal 77,4% nel 1995 al 90,2% nel 2000. Dal confronto tra la situazione rilevata nel 1995 con quella registrata al termine del 2000 (Figura 7), è possibile notare un miglioramento su quasi tutto il territorio nazionale, anche se nei confronti di questo requisito sono ancora molte le regioni che non raggiungono il parametro richiesto dalla normativa comunitaria (99,9%). In particolare è su quest'indice sanitario che l'Italia risulta più carente rispetto a quanto richiesto dalla normativa comunitaria; nonostante in molte regioni la prevalenza annua di TB sia ormai inferiore allo 0,1%; infatti, solamente il Trentino ha una percentuale di allevamenti U.I. superiore al 99,9% da più di 6 anni, mentre poche altre regioni (Friuli-Venezia Giulia, Lombardia, Emilia Romagna, Umbria e Sardegna) rispondono a questo requisito da circa 3-4 anni.

*Conclusioni*

Dove applicato, il piano nazionale di eradicazione ha dato risultati soddisfacenti. Nonostante ciò, le regioni che nel 1995 avevano un'elevata prevalenza di TB non raggiungono ancora, al termine del 2000, i requisiti sanitari richiesti dalla normativa nazionale e comunitaria. L'unica situazione particolarmente preoccupante è quella della Sicilia, i cui valori di prevalenza inoltre influenzano pesantemente anche gli indici sanitari nazionali. Vi sono alcune deficienze nel sistema informativo che non permettono una più approfondita valutazione dei motivi per i quali in alcune regioni il piano non ha dato i risultati sperati. A parte alcune carenze nella raccolta dei dati da parte di alcune regioni (Calabria, Abruzzo), mancano a livello centrale informazioni sulla percentuale di focolai confermati e sugli esiti delle indagini epidemiologiche, in particolare per quanto riguarda le cause di infezione degli allevamenti. Alla luce di quanto riportato appare opportuna una revisione del piano di eradicazione nazionale sia per renderlo conforme alla normativa comunitaria, sia per colmarne le carenze informative presenti.

| | | | |
|---|---|---|---|
|   |  | |  |
| Figura 1. Distribuzione per aree geografiche del patrimonio controllabile in Italia nel 2000 | Figura 2. Patrimonio controllabile per TB Bovina in Italia nel periodo 1995-2000 | Figura 3. Confronto tra le percentuali di infezione rilevate nelle regioni italiane nel 1995 e 2000 | Figura 4. Andamento della percentuale di allevamenti infetti/controllati e dell'incidenza annua di TB in Italia nel periodo 1995-2000 |

| | | | |
|---|---|---|---|
|  |  | | |
| Figura 5. Capi infetti da TB ed abbattuti in Italia, suddivisi per area nel periodo 1995-2000 | Figura 6. Numero di lesioni tubercolari segnalate al macello per 10.000 capi, suddivise per area nel periodo 1995-2000 | Figura 7. Confronto tra le percentuali di allevamenti UI da TB rilevate nelle regioni italiane nel periodo 1995-2000 | |

**La tubercolosi bovina in Lombardia**

*Premessa*

Fino al 1997, anno di entrata in vigore della direttiva 97/12, a livello comunitario non erano stati fissati requisiti sanitari per l'attribuzione della qualifica di allevamento ufficialmente indenne per le malattie soggette a piani di eradicazione. In Italia il conferimento delle qualifiche è fissato da decreti del Ministero della Salute. La L.9 giugno 1964, n.615 "Bonifica sanitaria degli allevamenti dalla tubercolosi e dalla brucellosi" prevede piani nazionali di attuazione delle operazioni di risanamento della tubercolosi bovina. Tali piani dovranno stabilire le misure per la protezione degli allevamenti indenni e i casi in cui sono obbligatori i trattamenti immunizzanti, l'esecuzione delle prove diagnostiche, la marcatura e l'abbattimento degli animali infetti. Con D.M. 30 giugno 1997 si sono rese obbligatorie, su tutto il territorio nazionale, le operazioni di profilassi e risanamento degli allevamenti bovini da tubercolosi e il programma di risanamento dalla tubercolosi a livello nazionale. Si è passati da una strategia di controllo e di contenimento ad interventi mirati alla eradicazione della Tubercolosi Bovina (TB), normati dal D.M. n. 592 del 15 dicembre 1995, che hanno portato ad una progressiva riduzione nel tempo della frequenza dell'infezione a livello regionale. La normativa vigente condiziona il rilascio della qualifica di ufficialmente indenne non più in base alla prevalenza dell'infezione, ma all'effettivo controllo ufficiale di tutti gli allevamenti presenti sul territorio ed al raggiungimento, durante l'anno, di una percentuale di allevamenti ufficialmente indenni pari al 99,8%. La Regione è dichiarata ufficialmente indenne da tubercolosi se tutte le sue province godono di tale qualifica. Ciò comporta che l'ottenimento della qualifica di ufficialmente indenne è un obiettivo qualitativamente diverso rispetto al mantenimento della prevalenza al di sotto di una soglia prefissata. Tale obiettivo può essere raggiunto solo intensificando le attività di sorveglianza epidemiologica rivolte alla prevenzione primaria.
Infatti, i programmi di eradicazione devono basarsi su una anagrafe bovina consolidata e aggiornata ed accompagnarsi all'acquisizione di dati epidemiologici che, opportunamente elaborati, consentano di individuare eventuali fattori di rischio associati alla persistenza e alla diffusione dell'infezione e che, messi a disposizione degli organi di governo sanitario, siano utili in ambito decisionale ai fini della programmazione dell'attività degli interventi di prevenzione.
Di eguale importanza è il monitoraggio quadrimestrale sull'andamento dell'infezione sul territorio, che consente di rilevare in itinere i focolai prevalenti (esistenti ad un determinato mese dell'anno solare), distinguendoli dai focolai incidenti (di nuova insorgenza nell'anno solare considerato).
La riduzione della frequenza dell'infezione, inoltre, rende opportuna l'esecuzione di accurati accertamenti diagnostici in caso di positività alle prove ufficiali, sia per una corretta individuazione dei focolai di malattia come per l'identificazione degli stipiti eventualmente in causa, con la loro mappatura a fini epidemiologici.

*Situazione Epidemiologica*

La regione Lombardia è caratterizzata da una superficie territoriale di 2.386.042 ettari di cui 1.096.495 di superficie agraria utilizzata con una popolazione totale di 9.121.714 abitanti. Il patrimonio bovino è costituito da circa 1.800.000 capi allevati in 30.928 aziende agricole prevalentemente indirizzate alla produzione di latte. Il latte prodotto annualmente ammonta a 39.615.000 di quintali di cui 8.089.000 prodotto per l'alimentazione diretta e 31.526.000 destinato alla trasformazione per la produzione di formaggi tra cui diversi a denominazione tutelata (Grana Padano, Parmigiano Reggiano, Gorgonzola, Provolone Valpadana, Taleggio, Quartirolo, Valtellina Casera, Bitto, Formai de Mut)
Nel corso del 2001 la Lombardia ha perso il riconoscimento nazionale per quanto riguarda la qualifica di territorio ufficialmente indenne da TB poiché, nel corso dell'anno, la percentuale di allevamenti infetti è stata superiore allo 0,2% in due delle undici province (Lodi e Pavia).
La storia sanitaria della regione nel corso degli ultimi dieci anni ha dimostrato come risulti spesso difficile mantenere i previsti parametri. In tabella 1 è riassunto l'andamento dei risultati della bonifica sanitaria relativa alla TB bovina in Lombardia nel periodo 1992-2000.

**Tabella 1.** Quadro riepilogativo della TB in Lombardia nel periodo 1992-2000

| | **1992** | **1993** | **1994** | **1995** | **1996** | **1997** | **1998** | **1999** | **2000** |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| all. controllabili | 24322 | 21794 | 18079 | 20507 | 19939 | 19572 | 18373 | 17813 | 16788 |
| all. controllati | 24322 | 21794 | 18079 | 20507 | 17536 | 19572 | 18373 | 17813 | 14772 |
| % all. controllati | 100,00 | 100,00 | 100,00 | 100,00 | 87,95 | 100,00 | 100,00 | 100,00 | 87,99 |
| capi controllabili | 1279305 | 1216822 | 1194421 | 1208145 | 1232611 | 1203066 | 1184877 | 1180377 | 1168861 |
| capi controllati | 1279305 | 1216822 | 1174164 | 1208145 | 1208111 | 1203066 | 1184877 | 1180377 | 1145349 |
| % capi controllati | 100,00 | 100,00 | 98,30 | 100,00 | 98,01 | 100,00 | 100,00 | 100,00 | 97,99 |
| controlli svolti (ingressi) | - | - | - | - | 22092 | 22682 | 19060 | 20959 | 18851 |
| controlli svolti (prove) | - | - | - | - | 1374911 | 1375001 | 1287215 | 1305193 | 1175682 |
| all. positivi | 209 | 166 | 128 | 111 | 121 | 63 | 36 | 14 | 22 |
| all. reifettati | 138 | 99 | 83 | 47 | 68 | 34 | 32 | 12 | 8 |
| capi positivi | 6025 | 4072 | 2402 | 3655 | 4646 | 2245 | 2077 | 773 | 717 |
| capi abbattuti | 3455 | 3622 | 2344 | 3609 | 4236 | 3384 | 2572 | 777 | 689 |
| segnalazioni mod. 10/33 | 165 | 36 | 294 | 46 | 21 | 20 | 28 | 75 | - |
| all. U.I | - | - | - | - | 19805 | 19545 | 18359 | 17799 | 16776 |
| % all. U.I | - | - | - | - | 99,30 | 99,90 | 99,90 | 99,90 | 99,90 |

*Piani Straordinari di controllo 1994 - 1996*

Nel corso degli ultimi dieci anni la qualifica di territorio ufficialmente indenne da TB è stata acquisita e revocata ben due volte. A seguito della presenza di numerosi focolai di TB, nel corso dell'anno 1994 si è ritenuto necessario predisporre un piano regionale di controllo straordinario. Il piano forniva diverse indicazioni operative ai Veterinari delle AA.SS.LL..e in particolare prevedeva l'adozione di criteri di severità nella lettura della prova, l'esecuzione della prova tubercolinica comparativa sull'intero effettivo degli animali in caso di reazioni non specifiche, la ricerca della collaborazione attiva del proprietario degli animali, l'esecuzione di un controllo più attento sulla movimentazione degli animali, la massima collaborazione fra veterinari operatori e veterinari ispettori nei macelli, la scelta dello stamping-out in particolari situazioni a rischio, l'esecuzione di un'attenta e approfondita indagine epidemiologica, l'impiego del test intradermico 2 o 3 volte all'anno negli allevamenti delle "province problema", la riduzione dei tempi per l'indennizzo degli allevatori, l' individuazione delle responsabilità a livello operativo. Nel 1994 è stata data inoltre l'opportunità di affiancare la prova intradermica con il test del gamma-interferon. Questo piano straordinario è stato successivamente integrato nel 1996 da indicazioni riguardanti: l'applicazione corretta delle norme sanitarie previste in sede di focolaio, il corretto flusso delle informazioni e dei dati raccolti, la collaborazione indispensabile tra i veterinari dei Servizi e i colleghi degli Istituti Zooprofilattici, la corretta compilazione della modulistica relativa all'indagine epidemiologica, l'impiego del gamma interferone secondo quanto previsto dal protocollo di intervento, l'accelerazione della chiusura dei focolai con l'abbattimento degli animali risultati positivi ad una delle due prove previste (intradermoreazione e gamma interferone), l'esecuzione di un doppio controllo nell'anno e infine l'attivazione di un sistema di sorveglianza sull'uso di sostanze illecite desensibilizzanti (isoniazide) su campioni di latte di massa. L'applicazione del

piano straordinario ha permesso alla Lombardia di riacquistare la qualifica di territorio ufficialmente indenne da TB nel 1998.

*Ruolo del macello*

Ai sensi del D. L.vo 196/99 , il macello, ai fini del mantenimento delle qualifiche sanitarie, deve necessariamente svolgere il ruolo di osservatorio epidemiologico. Infatti l'allegato A stabilisce che per il mantenimento della qualifica di allevamento ufficialmente indenne da TB devono essere rispettati precisi criteri tra cui quello che tutti i bovini macellati siano oggetto di una ricerca delle lesioni provocate dalla tubercolosi e queste ultime siano sottoposte ad un esame istopatologico e batteriologico per evidenziare il bacillo della tubercolosi. Al fine di rendere omogeneo sul territorio di competenza il sistema di rilevazione delle malattie trasmissibili all'uomo in tutti gli impianti di macellazione riconosciuti, nel corso dell'anno 2000 l'U.O. Veterinaria della Regione Lombardia ha emanato la circolare 44/SAN, "Attuazione dell'art. 16 del decreto legislativo 18 aprile 1994, n.286 - Attuazione delle direttive 91/497/CEE e 91/498/CEE concernenti problemi sanitari in materia di produzione ed immissione sul mercato di carni fresche". L'art. 16, del già citato D. L.vo 286/94, prevede la tempestiva comunicazione di diagnosi di malattie trasmissibili all'uomo al Servizio veterinario della ASL competente per i controlli nell'allevamento di origine e mensilmente alla Regione che elabora ed aggrega i dati per il successivo inoltro al Ministero della Salute. Tale attività dei servizi veterinari si inserisce a pieno titolo nel contesto della sicurezza alimentare e della tutela sanitaria degli allevamenti. In tabella 2, sono riassunti i dati relativi ai volumi di macellazione e al numero di patologie riscontrate nel periodo novembre 1998 – giugno 2000, rilevati in 10 macelli del territorio regionale in accordo a quanto previsto dal progetto pilota.

**Tabella 2.** Volumi di macellazione, numero e percentuale di patologie riscontrate in 10 macelli della Lombardia

| **numero bovini macellati** | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| anno | vacche | manze | vitelloni | vitelli | tori | totale |
| 1998 | 19076 | 5621 | 12752 | 14315 | 335 | 52099 |
| 1999 | 97893 | 30856 | 73073 | 72552 | 1691 | 276065 |
| 2000 | 52277 | 17152 | 38380 | 39797 | 298 | 147904 |
| totale capi | 169246 | 53629 | 124205 | 126664 | 2324 | 476068 |
| **numero patologie riscontrate** | | | | | | |
| 1998 | 175 | 4 | 15 | 0 | 0 | 194 |
| 1999 | 745 | 20 | 36 | 1 | 3 | 805 |
| 2000 | 447 | 8 | 18 | 1 | 2 | 476 |
| totale | 1367 | 32 | 69 | 2 | 5 | 1475 |
| % patologie | 0,81 | 0,06 | 0,056 | 0,01 | 0,21 | 0,31 |

Gli unici due casi rilevati nella categoria "vitelli" sono relativi ad un caso di cisticercosi e ad un caso di TB; i cinque casi nella categoria "tori" sono relativi a TB.
Nel 1999, in provincia di Lodi, ha iniziato l'attività il macello più grande d'Europa.
Presso tale impianto di macellazione sono stati rilevati su 93.846 capi bovini macellati nel corso del 1999 e provenienti da tutto il territorio nazionale 28 casi di TBC in bovini provenienti da allevamenti ufficialmente indenni (nuovi focolai) e 39 casi di TB sui 265 capi positivi alla prova tubercolina macellati in animali provenienti da allevamenti risultati infetti a seguito dei controlli svolti durante le operazioni di bonifica sanitaria..

*Segnalazioni di lesioni tubercolari al macello (mod. 10/33)*

In totale le segnalazioni al macello di lesioni riferibili alla tubercolosi nei bovini provenienti da allevamenti lombardi sono state 84 nel corso dell'anno 1999. A fronte di ciò non c'è stato un riscontro di pari entità negli allevamenti a seguito di prova intradermica sugli animali presenti. Gli esiti negativi a seguito di segnalazioni di lesioni alla visita post mortem sono stati fonte di dubbi e causa di incomprensioni tra i veterinari addetti al controllo degli allevamenti e i veterinari ispettori dei macelli provocando una caduta del livello di attenzione

in relazione al problema.
La regione Lombardia ha ritenuto pertanto indispensabile approntare un nuovo piano di controllo straordinario a seguito di segnalazione di riscontro di lesione tubercolare al macello.
Come prevede la normativa comunitaria, a seguito di riscontro alla visita ispettiva di lesioni tubercolari, il veterinario ispettore deve predisporre l'invio del materiale patologico alla sezione dell'IZS competente per territorio al fine di consentire l'effettuazione delle prove istologica, colturale e biologica. Tutto ciò per attestare l'effettiva causa della lesione.
Contemporaneamente il veterinario ufficiale competente per territorio, ricevuta la segnalazione pone vincoli sanitari sull'allevamento ed effettua la prova intradermica su tutti i capi.
In attesa dell'esito delle prove di laboratorio permangono le restrizioni delle movimentazioni degli animali sugli allevamenti.
Se il referto delle prove di laboratorio dovesse dare esito negativo, pertanto non si fosse in presenza di lesioni tubercolari, le misure restrittive vengono revocate. In caso contrario si effettua un'indagine supplementare sottoponendo tutti i capi bovini ad un'ulteriore prova intradermica, a un prelievo di sangue per il test del gamma interferone e a un controllo sul latte per la ricerca di sostanze illecite. Solo a seguito di positività della prova tubercolinica a del gamma interferone si dichiarerà l'allevamento infetto da TB. Questo intervento straordinario di controllo ha stimolato l'attenzione dei veterinari sul problema della tubercolosi garantendo, allo stesso tempo, la collaborazione delle persone coinvolte nei diversi livelli di controllo. Il supplemento di indagine, come previsto dalla normativa comunitaria (D.L.vo 196/99) con il prelievo al macello di campioni per la prova istologica e biologica e con il prelievo per la ricerca del gamma interferone, ha evidenziato 10 dei 17 focolai di tubercolosi segnalati in altrettanti allevamenti presenti in Lombardia.

*Caratterizzazione dei focolai*

Le indagini epidemiologiche effettuate nei singoli allevamenti sede di focolaio hanno mostrato come la maggior parte delle aziende fosse già stata interessata dall'infezione tubercolare negli anni precedenti. I dati epidemiologici raccolti hanno messo in evidenza come la diffusione dell'infezione tubercolare riguardi soprattutto allevamenti di grandi dimensioni (tabella 3).

**Tabella 3.** Distribuzione dei focolai per dimensione dell'allevamento

| **n° animali** | **n° focolai** |
|---|---|
| 1-10 | 3 |
| 11-50 | 3 |
| 51-100 | 3 |
| > 100 | 9 |
| **totale** | **18** |

In particolare sono aziende zootecniche bovine con un numero di animali superiore ai 100-200 capi, caratterizzate da una notevole movimentazione di animali sia in uscita, sia in entrata. A questo proposito ricordando che la movimentazione degli animali è uno dei principali fattori di rischio riassumiamo nelle tabelle 4 e 5 alcuni aspetti caratterizzanti il fenomeno movimentazione negli allevamenti sede di focolaio.

**Tabella 4.** Movimentazione di animali entrata ed uscita nei focolai

| | **n° focolai** | |
|---|---|---|
| movimentazione | introduzione | uscita |
| no | 5 | 2 |
| si | 8 | 11 |
| **totale** | **13** | **13** |

**Tabella 5.** Distribuzione dei focolai per tipologia di movimentazione e numero di animali movimentati

| tipo di movimentazione | n° focolai (*) | n° animali movimentati |
|---|---|---|
| **introduzione** | | |
| da allevamenti | 4 | 46 |
| da stalla di sosta | 3 | 40 |
| da commerciante | 1 | 2 |
| **uscita** | | |
| verso allevamenti | 7 | 105 |
| verso stalle di sosta | 8 | 75 |
| verso mercati | 2 | 15 |
| verso macelli | 6 | 39 |

(*)i focolai che hanno effettuato movimentazioni sia in entrata che in uscita sono conteggiati più volte

Un altro importante fattore di rischio è rappresentato dalla densità di animali in allevamento. Infatti, negli ultimi anni in Lombardia si è riscontrata la diminuzione del numero di aziende controllabili associata ad un numero di animali presenti pressochè costante.

*Prospettive*

L'Italia ha recepito con D. L.vo 22 maggio 1999 n.196 la direttiva CE 97/12, che modifica e aggiorna la direttiva 64/432/CEE relativa ai problemi di polizia sanitaria in materia di scambi intracomunitari di animali della specie bovina e suina. I criteri comunitari stabiliscono, tra l'altro, che per ottenere la qualifica di territorio ufficialmente indenne la percentuale di allevamenti infetti non deve superare lo 0,1% sul totale degli allevamenti presenti. Questo requisito deve essere mantenuto per sei anni consecutivi. In Lombardia, dove è presente circa il 25% del patrimonio bovino nazionale, hanno luogo circa il 70% degli scambi intracomunitari di animali. Appare pertanto ovvio che la regione sia particolarmente interessata dall'applicazione delle suddette normative comunitarie. Infatti, i controlli sanitari previsti nei trenta giorni precedenti la partenza dei bovini destinati agli scambi non sono richiesti nel caso in cui il territorio di origine degli animali sia riconosciuto ufficialmente indenne dalla malattia. Attualmente, le province che potrebbero ottenere il riconoscimento comunitario sono Sondrio per tubercolosi, brucellosi, leucosi; Lecco per brucellosi e leucosi, (tubercolosi a fine 2002); Varese per brucellosi; Brescia per brucellosi (tubercolosi a fine 2002) e Como per brucellosi.

I risultati ottenuti dall'attività di sorveglianza ed eradicazione della TB nel 2000 hanno portato alla perdita della qualifica di ufficialmente indenne da TB nelle province di Lodi e Pavia, con conseguente revoca della qualifica di territorio ufficialmente indenne per la regione Lombardia. Per far fronte a ciò, il Servizio Veterinario Regionale ha predisposto per l'anno 2002 il "Piano regionale straordinario di controllo nei confronti della tubercolosi – anno 2002". L'intervento, che per la maggior parte si ispira alla norma comunitaria in merito all'acquisizione delle qualifiche sanitarie, fissa i seguenti principi basilari.

*Movimentazioni*
Tutti gli animali che entrano in azienda provengono da allevamenti ufficialmente indenni da TB.
Prima di essere introdotti in un allevamento tutti i bovini siano stati sottoposti ad una intradermotubercolinizzazione che abbia dato risultato negativo. Detta prova deve essere eseguita nei trenta giorni precedenti all'introduzione. In deroga a quanto sopra è possibile effettuare la prova intradermica anche nei trenta giorni successivi alla data d'introduzione dell'animale nell'allevamento. In questo caso l'animale o gli animali introdotti devono essere isolati fisicamente dagli altri animali in modo da evitare qualsiasi altro contatto diretto o indiretto con essi fino all'avvenuta esecuzione della prova.

*Gamma interferon*
In considerazione della sensibilità attribuita alla prova del gamma interferon si ritiene opportuno utilizzare detta metodica nel caso in cui la prevalenza dell'infezione si attesti al di sotto della soglia prevista per l'applicazione dello stamping-out e, a seguito di conferma dell'analisi di laboratorio, nell'ambito del piano regionale straordinario di controllo a seguito di segnalazione di riscontro di lesioni tubercolari negli animali

da macello. L'utilizzo del gamma interferon a scopo diagnostico verrà autorizzato dall'U.O. Veterinaria della Regione sentito il Centro di Referenza e la Sezione Diagnostica dell'IZS competente per territorio. Le modalità di utilizzo di tale prova sono riportate nell'allegato II del Piano. Gli animali risultati positivi al test saranno abbattuti prontamente al pari di quelli risultati positivi alla prova intradermica.

*Stamping-out*
In considerazione della necessità di eradicare la malattia e di propendere pertanto per l'abbattimento totale degli animali presenti nelle aziende sedi di focolai, si ritiene di dover obbligatoriamente applicare tale pratica nei seguenti casi:
Quando la percentuale dei capi positivi ai test diagnostici supererà il valore soglia del 20%.
Quando nell'allevamento si manifesti una coda di infezione persistente. Tale valutazione verrà effettuata in base alla situazione epidemiologica e a seguito di valutazione dello stato sanitario dell'azienda nel corso dei sei anni precedenti e delle relative movimentazioni degli animali.
Quando, pur in presenza di una prevalenza compresa tra 1 e 20%, a seguito delle prove intradermiche effettuate negli otto mesi successivi al primo abbattimento si manifestino ulteriori casi positivi (mancata chiusura del focolaio).

La grande novità del Piano consiste nel controllo obbligatorio di tutti gli operatori del settore zootecnico addetti a mansioni che prevedano un diretto e prolungato o comunque frequente contatto con gli animali da allevamento. Il personale deve essere sottoposto a test tubercolinico mediante intradermoreazione secondo Mantoux all'atto dell'assunzione e successivamente con frequenza biennale Il Piano è stato predisposto in collaborazione con i Servizi di igiene e prevenzione umana. Tale scelta è stata determinata dal fatto che negli ultimi anni si sta delineando, in molti Paesi, un quadro epidemiologico caratterizzato da un incremento del numero di casi di tubercolosi nell'uomo.

**Epidemiologia descrittiva e stima dei costi di gestione d'alcuni focolai di tubercolosi bovina nella provincia di Lodi**

*Introduzione*

Il piano d'eradicazione della tubercolosi bovina (TB) ha portato nel tempo ad una riduzione della frequenza dell'infezione, anche se, come in tutte le fasi finali di questi piani, sono ancora presenti episodi di recrudescenza.
A maggior ragione, è indispensabile attivare, gestire ed eventualmente riprogrammare il sistema informativo per la raccolta di dati attendibili e l'elaborazione d'informazioni d'elevata qualità, che permetta da un lato la valutazione delle attività e dei risultati conseguiti nell'ambito dei piani d'eradicazione e dall'altro di monitorare l'evoluzione della situazione epidemiologica, al fine di evidenziare precocemente l'instaurarsi di tendenze negative.
La letteratura scientifica è ricca di studi sui fattori di rischio, associati all'introduzione del Mycobacterium bovis in allevamenti indenni ubicati in aree a bassa prevalenza d'infezione; poche informazioni sono disponibili sull'andamento dell'infezione tubercolare all'interno di tali allevamenti. La disponibilità e l'interpretazione di questi dati sono, d'altra parte, fondamentali per una efficiente gestione dei focolai, che si esplica nella riduzione del tempo di permanenza d'infezione, del rischio di contaminazione ambientale e dei costi di gestione del focolaio. In occasione del rilievo di positività all'intradermotubercolinizzazione (IDT) in un allevamento indenne, va eseguita l'indagine epidemiologica al fine di identificare o ipotizzare la fonte d'infezione, che nella maggior parte dei casi è ancora da attribuire all'introduzione d'animali infetti; e dall'altra di estinguere nel più breve tempo possibile la diffusione dell'infezione all'interno dell'allevamento. In pratica, però, nella gestione dei focolai, soprattutto se relativi ad allevamenti di una certa consistenza, si assiste al fenomeno frustrante dello stillicidio di positività all'IDT in prove successive,

confortata o no dal rilievo di lesioni tubercolari al macello e/o all'isolamento del M. bovis. Le conseguenze più evidenti di tale approccio sono la persistente apertura del focolaio e il notevole impegno di risorse umane.
Quello che accade all'interno degli allevamenti focolaio in termini d'epidemiologia descrittiva è poco noto e a tale riguardo esiste un approccio episodico: il veterinario, sulla base delle prove diagnostiche e la conoscenza della storia sanitaria dell'allevamento, formula ipotesi che lo guidano nel processo decisionale di gestione del focolaio nel rispetto della normativa. Le esperienze sono soggettive, diverse e affinchè possano diventare un utile patrimonio per tutti gli operatori sanitari sono necessari i dati oggettivi derivanti dagli esiti delle prove diagnostiche e dall'indagine epidemiologica, integrati ed opportunamente elaborati.
La provincia di Lodi rappresenta una realtà territoriale da sempre "problema per TB " e per questo motivo è stata scelta con l'intento di analizzare i dati relativi ad allevamenti di bovine da latte sede di focolaio di TB prevalenti nel periodo 1993-2000.
Considerato il carattere esplorativo dello studio, l'analisi descrittiva è stata limitata a nove allevamenti (tre focolai del 1993, un focolaio del 1994, due focolai del 1995, due focolai del 1996 e 1 focolaio del 2000. ) a causa della notevole mole di dati da informatizzare, perché disponibili solo su supporto cartaceo. Obiettivo principale dello studio, è stato quello di fornire una descrizione dell'andamento epidemiologico in termini di prevalenza e incidenza intra-allevamento dei casi di TB e dell'andamento delle operazioni di bonifica, attraverso l'uso d'indicatori opportunamente costruiti. Un secondo obiettivo è stato quello di fornire una stima dei costi di gestione dei focolai, confrontando i costi in caso di stamping-out alla prima prova di stalla positiva all'IDT.

## Materiali e metodi

*Popolazione di riferimento*
Lo studio è stato condotto in focolai di TB verificatisi nella provincia di Lodi, ubicata nella parte sud-occidentale della regione Lombardia e caratterizzata da una superficie territoriale di 782,36 Kmq, da un patrimonio bovino di circa 110.000 capi allevati in 559 aziende agricole, sostanzialmente indirizzate alla produzione di latte. Il latte prodotto annualmente ammonta a 3.915.000 quintali mentre il numero di capi bovini autoctoni macellati l'anno è di circa 150.000.

*Selezione degli allevamenti e raccolta dati*

Il criterio di selezione degli allevamenti sede di focolaio, è stato definito sulla base della numerosità dei dati da informatizzare e ritenuti sufficienti per una prima analisi di tipo esplorativo, che potesse fungere da prototipo per ulteriori estensioni agli altri focolai. Al fine di acquisire le informazioni necessarie alla valutazione dei nove focolai di TB selezionati, si è proceduto alla raccolta, presso il Servizio Veterinario dell'ASL della provincia di Lodi, della seguente documentazione:
1.modelli 1 riportante la data d'apertura e di chiusura del focolaio;
2.modelli 2/33 (schede di stalla), compilati contestualmente all'esecuzione dei tests di IDT eseguiti negli allevamenti sede di focolaio, dall'apertura fino alla sua chiusura;
3.ordinanze di sequestro sanitario degli allevamenti;
4.modelli 9/33, certificati sanitari comprovanti l'avvenuto abbattimento dei capi riconosciuti infetti, con l'indicazione del referto anatomo-patologico.
I dati raccolti sono stati informatizzati su Excel (Microsoft), organizzandoli in differenti fogli di calcolo.
L'unità d'osservazione considerata in questo studio è rappresentata dal singolo animale. Complessivamente sono stati inseriti nel database 3.663 codici identificativi d'animali presenti nei focolai indagati. Un foglio di calcolo è stato utilizzato come archivio degli abbattimenti, in cui sono state registrate tutte le informazioni riguardanti 973 animali risultati positivi all'IDT nel corso delle operazioni di bonifica sanitaria.
Di seguito è riportato l'elenco dei campi utilizzati:
1. codici identificativi univoci d'ogni focolaio;
2. date in cui sono stati effettuati i controlli che hanno portato all'evidenziazione dei primi capi positivi e, quindi, all'apertura dei focolai;
3. marchi d'identificazione di tutti i bovini testati in occasione di tali controlli;
4. date dei successivi controlli effettuati negli allevamenti, fino alla chiusura dei focolai;
5. matricole d'identificazione dei bovini riscontrati infetti in occasione dei vari controlli;
6. categoria degli animali (vitello/manza/vacca)

7. date di macellazione dei capi infetti;
8. reperti anatomo-patologici rilevati in sede di macellazione;
9. date d'apertura e chiusura dei focolai;
10. date della lettura dei tests d'IDT;
11. codice identificativo adottato convenzionalmente per definire il tipo della lesione anatomo-patologica eventualmente rilevata in sede di macellazione;
12. codice identificativo adottato convenzionalmente per definire la motivazione per l'abbattimento (positività all'IDT oppure per stamping-out).
13. data d'abbattimento dell'ultimo capo positivo;
14. data di riottenimento della qualifica sanitaria d'Ufficialmente Indenne (U.I.).

*Indicatori epidemiologici*

Sulla base dei dati raccolti sono stati ricavati i seguenti indicatori epidemiologici:
1. prevalenza degli animali IDT positivi al primo controllo ufficiale (apertura del focolaio), grezza e specifica per categoria d'animali: calcolata come la proporzione tra animali positivi sul numero di animali testati al primo controllo ufficiale.
2. incidenza cumulativa grezza e specifica per categoria d'animali, durante il corso delle operazioni di bonifica dei focolai: calcolata per ogni controllo come numero di nuovi casi d'animali positivi all'IDT diviso il numero d'animali a rischio (animali testati negativi al precedente controllo).
3. prevalenza d'animali IDT positivi con lesioni al macello grezza e specifica per categoria d'animali: calcolata come proporzione tra il numero d'animali IDT positivi con riscontro di lesioni al macello sul numero di animali risultati positivi all' IDT positivi.
4. prevalenza degli animali "NO VISIBLE REACTORS" (NVR): calcolata come la proporzione tra il numero d'animali IDT positivi senza riscontro di lesioni al macello sul numero di animali IDT positivi.
5. tempo di permanenza in allevamento degli animali IDT positivi: calcolato come la differenza espressa in giorni tra la data di lettura dell'IDT e la data d'invio al macello dei singoli animali.
6. numero d'invii al macello necessari per l'eliminazione di tutti i capi IDT positivi: ricavato dalle indicazioni riportate sul certificato sanitario Mod.9/33 d'avvenuto abbattimento.
7. tempo d'apertura del focolaio: calcolato come la differenza espressa in giorni tra la data di lettura del primo test intradermico e la data dell'invio al macello dell'ultimo capo riscontrato positivo in occasione dell'ultimo controllo.
8. tempo di riottenimento della qualifica sanitaria d'U.I.: calcolato come la differenza espressa in giorni tra la data dell'invio al macello dell'ultimo capo riscontrato positivo, in occasione dell'ultimo controllo e la data dell'ultima prova negativa effettuata a scadenza di legge.

*Parametri utilizzati per calcolare i costi*

La quantificazione dei costi riferiti a ciascuno degli allevamenti sede di focolaio è stata effettuata tenendo in considerazione i seguenti parametri:
1. costo della singola dose d'allergene (P.P.D.): Euro 0,17 (£ 300 + IVA 10%);
2. costo della prestazione relativa al Test d'IDT quantificato come "Tempo Medio di Riferimento" in Regione Lombardia per l'effettuazione delle attività connesse alla bonifica sanitaria che, secondo i parametri 1995 riferiti l'anno 1993, corrispondeva a 10 minuti e 4 secondi, arrotondato per difetto. Visti i conteggi effettuati nell'ambito del Settore Veterinario dell'A.S.L. della provincia di Lodi per l'anno 1998, il costo orario complessivo di un Dirigente Veterinario assommava a Euro 44,07 ( £ 85.340). Richiamate le indicazioni ministeriali concernenti l'ispezione delle carni nell'ambito di un impianto di macellazione, il costo orario di un Dirigente veterinario è stato codificato in Euro 36,15 (£ 70.000). Secondo quanto disposto con Decreto Ministeriale del 1988 ed indipendentemente dal tempo impiegato per la verifica, per ogni IDT effettuata da Veterinari incaricati in regime libero professionale è corrisposta la cifra di Euro 0,57 (£ 1.100). Il costo della prestazione è stato ricavato dalla media aritmetica dei valori relativi, rispettivamente, ai veterinari dipendenti dall'A.S.L. della provincia di Lodi nell'anno 1998, alla quantificazione codificata in ambito ministeriale ed al compenso dovuto ai Veterinari incaricati in regime libero professionale;
3.il costo dell'indennità d'abbattimento relativa ad ogni bovino riconosciuto infetto, pari a Euro 30,51 (£ 590.000).

**Epidemiologia descrittiva dei focolai di TB**

Complessivamente, nei 9 focolai considerati, sono stati testati 7.677 capi di cui 973 sono risultati positivi all'IDT e 548 hanno presentato lesioni all'ispezione post-mortem al macello. All'apertura dei focolai sono stati testati 2.187 animali di cui 128 (5.8%) sono risultati positivi all'IDT.

*Prevalenza*
Nel grafico 1 è visualizzata la distribuzione della prevalenza d'animali IDT all'apertura del focolaio nei 9 focolai. In media, la prevalenza riscontrata è stata pari al 8.1%. Il 50 % dei focolai analizzati al momento del primo controllo aveva una prevalenza complessiva d'animali positivi all'IDT uguale o inferiore al 4,9%. La prevalenza più bassa riscontrata è stata dello 0,4% e la più elevata del 25,4%.

Nella tabella 1 è riportata la distribuzione della prevalenza specifica per categoria d'animali all'apertura dei focolai analizzati.

**Tabella 1.** Distribuzione della prevalenza specifica per categoria d'animali all'apertura dei focolai

| categoria5,8% | testati | IDT positivi | prevalenza |
|---|---|---|---|
| vitelli | 209 | 1 | 0,48% |
| manze | 791 | 7 | 0,88% |
| vacche | 1187 | 120 | 10,1% |
| **totale** | **2187** | **128** | |

*Incidenza Cumulativa (IC)*

Nelle tabelle 2 e 3 è riportata l'incidenza cumulativa di TB, suddivisa nei diversi controlli eseguiti e per categoria animale colpita.

**Tabella 2.** Andamento dell'incidenza cumulativa di TB nei controlli successivi all'apertura del focolaio

| n° controlli | n° focolai | capi controllati | positivi | incidenza cumulativa |
|---|---|---|---|---|
| 1 | 9 | 2187 | 128 | 5,9 |
| 2 | 7 | 1899 | 134 | 7,1 |
| 3 | 4 | 1352 | 599 | 44,3 |
| 4 | 3 | 737 | 52 | 7,1 |
| 5 | 2 | 634 | 28 | 4,4 |
| 6 | 1 | 657 | 19 | 2,9 |
| 7 | 1 | 211 | 13 | 6,2 |

**Tabella 3.** Andamento dell'incidenza cumulativa di TB specifica per categoria animale, nei controlli successivi all'apertura del focolaio

| n° controlli | n° focolai | vitelli | | | manze | | | vacche | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | testati | positivi | incidenza % | testate | positive | incidenza % | testate | positive | incidenza % |
| 1 | 9 | 209 | 1 | 0,5 | 791 | 7 | 0,9 | 1187 | 120 | 10,1 |
| 2 | 7 | 218 | 1 | 0,5 | 787 | 25 | 3,2 | 894 | 108 | 12,1 |
| 3 | 4 | 211 | 20 | 9,5 | 496 | 172 | 34,7 | 645 | 407 | 63,1 |
| 4 | 3 | 24 | 0 | 0,0 | 578 | 40 | 6,9 | 135 | 12 | 8,9 |
| 5 | 2 | 228 | 4 | 1,8 | 285 | 9 | 3,2 | 121 | 15 | 12,4 |
| 6 | 1 | 179 | 9 | 5,0 | 354 | 4 | 1,1 | 124 | 6 | 4,8 |
| 7 | 1 | 8 | 1 | 12,5 | 91 | 1 | 1,1 | 112 | 11 | 9,8 |

Dall'andamento dell'incidenza di TB, si può notare che al primo controllo essa si attesta su valori del 5,9%, per poi innalzarsi al terzo controllo al 44,3% e diminuire nei successivi ed ulteriori controlli a valori tra il 2,9 e il 7,1%. La variabilità dell'IC tra i diversi focolai è risultata molto ampia, a causa della scarsa numerosità del campione considerato (9 focolai). Ciononostante, poiché oltre alla media, anche i valori minimi e massimi (dati non presentati) seguono un trend comune nei diversi focolai, e tenendo conto che l'incidenza al terzo controllo è stata significativamente influenzata dall'elevato livello di positività riscontrato in un solo allevamento, sembrerebbe che il rischio di positivizzazione all'IDT in controlli successivi all'apertura del focolaio rimanga costante durante tutta l'operazione di bonifica. Considerando l'andamento dell'IC specifica per categoria di animale nei diversi controlli si può notare che al primo controllo, successivo all'apertura de focolaio, l'incidenza di TB nei vitelli e nelle manze varia dallo 0,5 allo 0,9%, valori minimi ma non trascurabili, in quanto rappresentano un indicatore della presenza di una forma di TB in piena evoluzione e diffusione in allevamento. Si può notare infatti che, soprattutto nei focolai con un'elevata incidenza nelle bovine adulte, si evidenziano nel prosieguo dei controlli una maggiore incidenza di casi nei vitelli e nelle manze, rispettivamente il 9,5% e il 34,7% al terzo controllo, probabilmente spiegabile sulla base dell'esposizione dei soggetti ad un maggior carico infettante presente nell'ambiente. Le bovine da latte adulte rappresentano la categoria maggiormente colpita dall'infezione tubercolare al primo controllo (incidenza del 10,1%), anche in questo caso la presenza di un singolo allevamento che al 3° controllo ha manifestato un notevole aumento di animali positivi, condiziona l'interpretazione dei risultati, ma riteniamo sia possibile ancora fornire qualche punto di discussione. Mediamente l'incidenza cumulativa nelle vacche tende ad aumentare nei primi controlli successivi all'apertura dei focolai per poi attestarsi su valori che variano dal 4,8% al 12, 4%. Possiamo ipotizzare che se questo andamento dell'IC sia da attribuire a diversi fattori:

1. l'infezione evidenziata al primo controllo si è diffusa in allevamento e ha sensibilizzato altri capi;
2. la lettura della prova tubercolinica è stata più accurata nei controlli successivi all'apertura del focolaio e comunque ritenuta positiva anche nel caso di dubbio; una sorta di effetto di sensibilizzazione dell'operatore che in presenza di una reattività all'IDT tende ad aumentare la soglia di attenzione per far fronte al problema.
3. alcuni capi potevano risultare negativi alla prima prova in quanto nel periodo d'incubazione della malattia.

Il reiterarsi di nuove positività nei successivi controlli è comunque indice di un'infezione in atto e in corso di diffusione con conseguente contaminazione ambientale, che riduce le possibilità di addivenire all'estinzione del focolaio in tempi brevi, e quando anch'essa si verificasse, esporrebbe l'allevamento al rischio di successive reinfezioni.

*Riscontro di lesioni tubercolari al macello*

In totale, 548 su 973 (56,3%) animali risultati IDT positivi nel corso delle operazioni di bonifica mostravano lesioni tubercolari alla visita ispettiva. Di questi il 86,0% erano Vacche, il 12,6% Manze e il 1,5% Vitelli. All'apertura dei focolai il 72,6% degli animali risultati positivi all'IDT presentavano lesioni alla visita ispettiva. Di questi il 90,3% presentava un Complesso Primario Completo (CPC), il 4,3% lesioni riferibili ad un Complesso Primario Incompleto (CPI), il 3,2% ad una Generalizzazione Precoce (GP) e il 2,1% ad una Generalizzazione Tardiva (GT).
In 88 /120 vacche positive alla prima IDT si sono riscontrate lesioni tubercolari al macello; di queste, il 93 % presentavano un CPC, il 1,1% un CPI, il 3,4% la GP e il 2,2% la GT. Tra i 973 soggetti reattivi all'IDT presenti nei focolai , il 44% è classificabile come "No Visible Reactor", di questi il 50.8% sono vacche, il 42,5% Manze e il 6,7% Vitelli.

*Tempi di permanenza degli animali infetti in allevamento*

Il tempo mediano di permanenza in allevamento degli animali infetti è stato di 16 giorni.
Il grafico 2 riporta la distribuzione dei giorni di persistenza degli animali in allevamento in forma di frequenza e di % cumulativa.

Più del 90% degli animali mostra un tempo di permanenza in allevamento inferiore o uguale a 26 giorni, mentre il restante 10% d'animali permane per un tempo superiore. Tra le diverse categorie d'animali, le vacche sono quelle che mediamente permangono di più in allevamento (20 giorni) rispetto ai 15 e 13 giorni, rispettivamente dei vitelli e delle manze. Considerato che il termine temporale previsto dalla legge per

inviare al macello gli animali positivi è di 30 giorni al massimo, si può rilevare come questa scadenza sia rispettata nella maggior parte dei casi.

*Invii al macello*

Mediamente il numero d'invii al macello necessari per abbattere tutti capi risultati positivi durante le operazione di bonifica era di circa 3 , con un minimo di 1 invio ed un massimo di 14 invii, corrispondenti al focolaio 1/94, in cui sono stati riscontrati 454 animali IDT positivi.
Il numero medio d'invii al macello è stato significativamente correlato (Sperman Rho=0.68 $p<0.0001$) al numero medio d'animali IDT positivi da macellare nei diversi controlli, e al tempo massimo di permanenza in allevamento degli animali (Sperman Rho = 0.75 $p<0.0001$).
Questi risultati, tutto sommato attesi, indicano che all'aumentare del numero d'animali IDT positivi da macellare, aumenta il numero d'invii al macello necessari per "risanare" l'allevamento e di conseguenza il tempo medio di massima permanenza in allevamento degli animali positivi. Tali risultati vanno comunque interpretati con cautela in quanto è risultata notevole la variabilità dei parametri sopraindicati, a causa del numero esiguo di focolai.

*Tempo d'estinzione dei focolai e tempo necessario per il riottenimento della qualifica sanitaria*

Nella tabella 4 sono riportate le caratteristiche di ciascun focolaio, con particolare riferimento ai tempi d'estinzione dei focolai e di riottenimento della qualifica sanitaria.

**Tabella 4.** Descrizione dei focolai con i giorni impiegati per giungere alla chiusura del focolaio e per il riottenimento della qualifica sanitaria

| cod focolaio | n° controlli | n° capi testati | n° capi IDT positivi | n° capi positivi al macello | chiusura focolaio (giorni) | nuova qualifica U.I (giorni) |
|---|---|---|---|---|---|---|
| 1/93 | 4 | 395 | 57 | 51 | 337 | 259 |
| 1/94 | 6 | 3614 | 600 | 286 | 348 | 585 |
| 1/96 | 2 | 153 | 18 | 17 | 59 | 364 |
| 2/00 | 3 | 352 | 122 | 43 | 127 | 417 |
| 2/93 | 2 | 149 | 12 | 11 | 68 | 313 |
| 2/95 | 1 | 41 | 2 | 2 | 11 | 189 |
| 2/96 | 1 | 268 | 1 | 1 | 11 | 245 |
| 3/93 | 7 | 1801 | 132 | 115 | 483 | 250 |
| 3/95 | 2 | 904 | 29 | 22 | 110 | 217 |
| **totale** | | **7677** | **973** | **548** | | |

Come prevedibile, quanto maggiore è il numero d'animali positivi e tanto maggiore è il tempo necessario per estinguere il focolaio e per riottenere la qualifica di ufficialmente indenne da TB.
Si sottolinea come nei focolai 1/93, 3/93 e 1/94 l'estinzione abbia comportato un periodo di circa un anno e oltre.

*Considerazioni sui costi sostenuti per l'estinzione dei focolai*

Nella tabella 5 sono riassunti i costi parziali per ogni singola voce considerata e il costo totale relativo ad ogni focolaio di TB selezionato per lo studio.

**Tabella 5.** Costi totali dei focolai di TB per controlli ripetuti, suddivisi nei costi parziali relativi alla P.P.D. bovina, alla prestazione veterinaria e all'indennizzo dei capi abbattuti.

| cod foc | capi testati | capi positivi | costi P.P.D (£) | prestazione veterinaria (£) | costo indennità (£) | costo totale (£) | costo totale (€) |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 1/93 | 395 | 57 | 130350 | 3433011 | 33630000 | 37193361 | 19208,77 |
| 2/93 | 149 | 12 | 49170 | 1294984 | 7080000 | 8424154 | 4350,71 |
| 3/93 | 1801 | 132 | 594330 | 15652791 | 77880000 | 94127121 | 48612,60 |
| 1/94 | 3614 | 600 | 1192620 | 31409876 | 354000000 | 386602496 | 199663,53 |
| 2/95 | 41 | 2 | 13530 | 356338 | 1180000 | 1549868 | 800,44 |
| 3/95 | 904 | 29 | 298320 | 7856815 | 17110000 | 25265135 | 13048,35 |
| 1/96 | 153 | 18 | 50490 | 1329749 | 10620000 | 12000239 | 6197,61 |
| 2/96 | 268 | 1 | 88440 | 2329233 | 590000 | 3007673 | 1553,33 |
| 2/00 | 352 | 122 | 116160 | 3059291 | 71980000 | 75155451 | 38814,55 |
| **totali** | **7677** | **973** | **2533410** | **66722087** | **574070000** | **643325497** | **332249,89** |

I costi nel caso in cui l'estinzione del focolaio fosse stata attuata tramite la macellazione totale degli animali a seguito del primo controllo, è stata calcolata tenendo in considerazione i costi della prestazione veterinaria e della PPD bovina relativa al numero dei capi controllati al primo prelievo più il costo dell'indennità d'abbattimento dei soli capi positivi alla prima prova (tabella 6).

**Tabella 6.** Costi sostenuti in occasione del primo controllo in ciascun allevamento focolaio

| cod foc | capi testati | capi positivi | costi P.P.D (£) | prestazione veterinaria (£) | costo indennità (£) | costo totale (£) | costo totale (€) |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 1/93 | 114 | 29 | 37620 | 990793 | 17110000 | 18138413 | 9367,71 |
| 2/93 | 82 | 6 | 27060 | 712676 | 3540000 | 4279736 | 2210,30 |
| 3/93 | 307 | 34 | 101310 | 2668188 | 20060000 | 22829498 | 11790,45 |
| 1/94 | 725 | 30 | 239250 | 6301096 | 17700000 | 24240346 | 12519,09 |
| 2/95 | 41 | 2 | 13530 | 356338 | 1180000 | 1549868 | 800,44 |
| 3/95 | 464 | 10 | 153120 | 4032701 | 5900000 | 10085821 | 5208,89 |
| 1/96 | 79 | 12 | 26070 | 686602 | 7080000 | 7792672 | 4024,58 |
| 2/96 | 268 | 1 | 88440 | 2329233 | 590000 | 3007673 | 1553,33 |
| 2/00 | 107 | 4 | 35310 | 929955 | 2360000 | 3325265 | 1717,36 |
| **totali** | **2187** | **128** | **721710** | **19007582** | **75520000** | **95249292** | **49192,15** |

Dal confronto tra i costi totali sostenuti, ai fini della estinzione dei focolai, nel caso di controlli ripetuti (tabella 5) e sostenibili nel caso si fosse deciso l'abbattimento di tutto l'effettivo già dopo il primo controllo positivo alla IDT (tabella 6), si rileva una differenza di oltre mezzo miliardo.
Questo dato economico, unitamente alla diminuzione del rischio di persistenza e di diffusione di M. bovis nell'ambito dell'allevamento, rende credibile il concetto di procedere allo stamping-out in occasione del primo riscontro di positività.
Quanto sopra anche in considerazione dei danni economici derivanti al singolo allevatore per la limitazione nella movimentazione degli animali e nell'utilizzo del latte ed anche in relazione all'eventuale sospensione della qualifica sanitaria regionale.

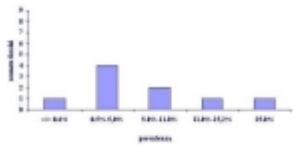


Grafico 1. Prevalenza della TB all'apertura dei focolai

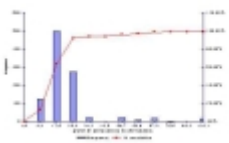


Grafico 2. Distribuzione dei giorni di permanenza degli animali in allevamento (frequenza e % cumulativa)

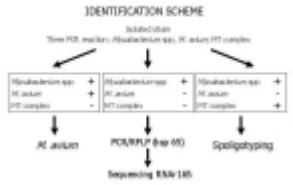
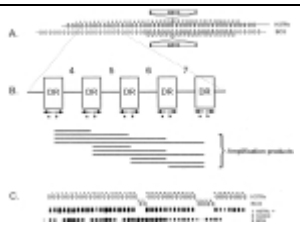
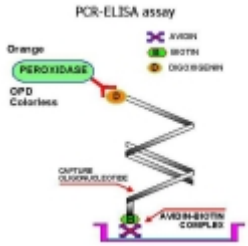
**Diagnosi di tubercolosi bovina: problemi diagnostici e nuove strategie**

Gli Istituti Zooprofilattici Sperimentali sono coinvolti nella diagnosi di tubercolosi bovina per quanto riguarda gli eventuali approfondimenti diagnostici post mortem ritenuti necessari dopo una prova tubercolinica dubbia o per conferma di lesioni sospette al macello.
Tra le prove previste dal DM 592/95 ricordiamo l'esame anatomo-isto-patologico, la ricerca di batteri acido-resistenti mediante strisci o sezioni sottoposti a colorazione Ziehl-Nielsen, l'evidenziazione di antigeni micobatterici in sezioni di tessuto, la prova biologica e l'isolamento di *Mycobacterium bovis* da materiale patologico, che malgrado la lentezza ed la possibilità di contaminazione, resta il metodo di riferimento "gold standard" per la conferma d'infezione.
Le nuove tecniche diagnostiche molecolari basate sulla reazione PCR o altre tecniche di amplificazione (Bollo et al., 1998; Vitale et al., 1998;), pur essendo rapide e poco indaginose, non sono riuscite a sostituire con la stessa affidabilità e sensibilità l'isolamento di *M. bovis* da campione clinico (Wards et al., 1995; Roring et al., 2000; Office International des Epizooties, 2000); tuttavia possono essere utilizzate a scopo identificativo e/o di tipizzazione a partire dal ceppo isolato in alternativa ai metodi biochimici tradizionali per la loro maggiore rapidità e capacità differenziativa.
Uno degli obiettivi che l'Istituto Zooprofilattico Sperimentale di Brescia (IZSLER) sta perseguendo, in considerazione del ruolo di centro di referenza per la tubercolosi da M. bovis recentemente acquisito, è la ricerca di nuove strategie per ridurre i tempi di conferma diagnostica mantenendo l'isolamento di *M. bovis* come metodo di riferimento. Per tale motivo è nostra intenzione valutare in parallelo ai metodi tradizionali, un sistema automatizzato per l'isolamento di micobatteri MGIT 960 (Becton Dickinson Diagnostic Instruments System, Sparks, Md), già sperimentato con successo su Mycobacterium tuberculosis (Tortoli et al., 1999; Jayakumar et al., 2001; Whyte et al., 2000), che dovrebbe ridurre i tempi di crescita anche di *M. bovis*. Per quanto riguarda la fase di identificazione stiamo applicando, in parallelo alle prove biochimiche e colturali, un insieme di tecniche molecolari standardizzate e verificate su numerosi ceppi da campo in collaborazione con tutti gli Istituti Zooprofilattici nell'ambito di un progetto di ricerca finanziato dal Ministero della Sanità. In figura 1 sono illustrate le fasi della procedura di isolamento dei micobatteri.
Questo schema di lavoro prevede che sul ceppo isolato vengano eseguite inizialmente tre reazioni PCR (Kulski et al., 1993): una specifica per il genere Mycobacterium, una specifica per micobatteri appartenenenti al gruppo M. tuberculosis (MT) complex ed una specifica per M. avium. A seconda della combinazione dei risultati ottenuta si procede con diverse strategie. Si arriva all'identificazione immediata di M. avium in caso di reazioni PCR positive per il genere *Mycobacterium e M. avium* e negativa per MT complex; si applica la sequenziazione dell'RNAr 16S mediante il kit Microseq (Applied Biosystem) (Patel et al. 2000) e/o il saggio PCR/RFLP descritto da Telenti et al. (1995) se si ottiene positività solo per il genere *Mycobacterium*; si applica il saggio "Spoligotyping" (Kamerbeek et al., 1997) se il ceppo viene identificato come appartenente al MT complex.
Il saggio Spoligotyping è basato sul polimorfismo del locus DR (short repetitive direct repeats) presente nel genoma di tutti i micobatteri appartenenti al MT complex (Hermans et al.,1991); i pattern polimorfici chiamati spoligotipi sono il risultato delle combinazioni ottenute ibridando i prodotti PCR del locus DR con 43 oligonucleotidi corrispondenti alle 43 sequenze intersperse o "spacers" presenti tra le DR (Figura 2).
L'analisi Spoligotyping (figura 3) ci permette di :
- Identificare *M. bovis* all'interno del MT complex grazie ad alcune caratteristiche peculiari del locus DR di *M. bovis*: assenza degli "spacers" 3,9,16 e 39-43 (figura 3);
- Differenziare all'interno della specie *M. bovis* la subspecie caprae descritta recentemente da Aranaz et al. 1999, correlata alla specie ospite capra e caratterizzata dall'assenza degli "spacers" 3-16 (figura 3);
- Ottenere una preliminare differenziazione genetica dei ceppi isolati di M. bovis confrontabile, dove possibile, con banche dati degli spoligotipi presenti in altri paesi europei. L'analisi mediante Spoligotyping di 162 ceppi di M. bovis isolati dal 1999 al 2001 nel territorio di nostra competenza comprendente le regioni Lombardia ed Emilia-Romagna ci ha permesso una prima valutazione delle caratteristiche genetiche dei ceppi di *M. bovis* circolanti in Italia. I ceppi sono stati suddivisi in 40 spoligotipi distinti di cui i maggiormente diffusi sono presentati in figura 3:
- Il 38% dei ceppi appartiene allo spoligotipo BCG-like, caratterizzato dall'assenza degli "spacers" 3,9,16 e 39-43 (vedi Sp1 di figura 3), lo spoligotipo maggiormente diffuso in Francia (Haddad et al., 2000), presente in Spagna (Aranaz et al., 1996), segnalato in Belgio e mai trovato in Gran Bretagna (Haddad et al., 2000).
- La subspecie caprae è presente nel 12% dei ceppi analizzati (vedi Sp8, Sp9, Sp10 di figura 3);

- Non sono stati trovati gli spoligotipi maggiormente diffusi in Irlanda e Gran Bretagna con l'eccezione di uno spoligotipo caratterizzato dall'assenza degli "spacers" 6, 8, 10-12 oltre a quelli caratteristici di *M. bovis* (3, 9, 16, 39-43) presente solamente in uno dei ceppi esaminati;
- Presenza con percentuali del 5% e del 2,5% di alcuni spoligotipi descritti in Francia e Spagna (vedi Sp 3, Sp5 e Sp7 di figura 3);
- Bassa prevalenza di uno spoligotipo molto diffuso in Francia e Spagna, caratterizzato oltre che dall'assenza degli spacers caratteristici di *M. bovis* anche dello spacer 21, trovato in un solo ceppo ma precedentemente segnalato in alcuni ceppi isolati da cinghiale in Liguria (Serraino et al., 1999).

Questi risultati ci permettono alcune considerazioni: innanzitutto è necessario estendere l'analisi Spoligotyping sul maggior numero possibile di ceppi di M. bovis isolati in Italia. A tale scopo abbiamo, sempre nell'ambito del progetto di ricerca nazionale precedentemente citato, sviluppato e trasferito a tutti gli Istituti Zooprofilattici un sistema Spoligotyping alternativo non basato sull'ibridazione su filtro come descritto da Kamerbeek et al. (1997), ma sull'ibridazione in piastrina ELISA (saggio PCR-ELISA), come illustrato in figura 4, facilitando l'applicazione del metodo anche in laboratori non specificamente attrezzati per Biologia Molecolare. Tuttavia, per una efficace applicazione in campo epidemiologico, è necessario migliorarne la capacità differenziativa specialmente nel caso il ceppo appartenga ad uno spoligotipo molto frequente come il BCG-like. Il suggerimento di alcuni autori (Durr et al., 2000) è di utilizzare lo Spoligotyping per un rapido screening iniziale dei ceppi di *M. bovis*, affiancando in un secondo tempo, altri metodi di subtipizzazione maggiormente informativi come l'analisi VNTR (Frothingham et al., 1998).

In prospettiva la raccolta dei ceppi da parte della rete zooprofilattica italiana e l'attuazione di validi metodi di tipizzazione molecolare dovrebbero consentirci di organizzare una banca dati dei profili genetici della maggior parte dei ceppi di *M. bovis* circolanti in Italia, al fine di fornire un valido supporto alle indagini epidemiologiche tradizionali per una maggiore comprensione delle vie di diffusione e trasmissione della tubercolosi bovina sul territorio nazionale.

| | | | |
|---|---|---|---|
|   |  | |   |
| Figura 1. Schema di identificazione dei ceppi di micobatteri spp | Figura 2. Struttura del locus DR e schema di amplificazione (Da Kamerbeek et al. 1997) (A) struttura del locus DR del genoma di M.tuberculosis H37Rv e di M. bovis BCG in cui è mostrato il sito di integrazione dell'1S6110. (B) Schema dell'amplificazione in vitro della regione DR mediante PCR. Ogni DR può servire come "target" per i primers, perciò il DNA amplificato è formato da una miscela di frammenti di diversa dimensione. La figura mostra la combinazione dei frammenti, che dovrebbero essere prodotti dall'amplificazione in vitro di un "target" contenente solo cinque DR. (C) Patterns d'ibridazione (spoligotipi) dei ceppi di riferimento M.tuberculosis H37Rv e M.bovis BCG (Kameerbek et al. 1997). L'ordine degli "spacers"sul filtro corrisponde al loro ordine del genoma | Figura 3. Risultati spoligotyping di alcuni ceppi di M. bovis rappresentativi degli spoligotipi maggiormante diffusi in Italia . I numeri da 1 a 43 in alto indicano gli "spacers". I colori rosso e viola indicano ibridazione positiva, il colore bianco ibridazione negativa. I ceppi ATCC2794 ed H37Rv sono ceppi di referenza di M.tuberculosis | Figura 4. Schema di ibridazione mediante PCR-ELISA |