

L'OSSERVATORIO



**RIVISTA BIMESTRALE
D'INFORMAZIONE
SCIENTIFICA**
*a cura dell'Osservatorio
Epidemiologico Veterinario
della Regione Lombardia*



Sommario



Direttore responsabile
Cesare Bonacina

Direttore scientifico
Paolo Boni

Redattore
Giorgio Zanardi

*Responsabile comitato
redazione*
Giorgio Zanardi

Comitato di redazione
M. Astuti, P. Cordioli,
M. Domenichini, P. Antonioli,
L. Gemma, C. Genchi,
G. Gridavilla, A. Lavazza,
A. Palma, V. M. Tranquillo,

*Hanno collaborato
a questo numero:*
G. Zanardi, C. Bonacina

Segreteria di redazione
M. Guerini,
L. Marella

Composizione e Stampa
Eurocolor s.n.c.
Via Borsellino, 9
25038 Rovato - Brescia
Tel. 030 7721730
Fax 030 7701261
www.eurocolor.net

Editore
Istituto Zooprofilattico
Sperimentale della Lombardia e
Emilia Romagna
"Bruno Ubertini"
Via Bianchi, 9 - 25124 Brescia
Tel. 03022901 - Fax 030225613

Speciale Tubercolosi

- 3 Editoriale
- 4 Rassegna sulla tubercolosi bovina da *Mycobacterium bovis*
G. Zanardi, C. Bonacina

Tutti coloro che vogliono scriverci, devono indirizzare le lettere al seguente indirizzo:

**"L'OSSERVATORIO" rubrica "La posta dei lettori",
via Bianchi, 9 - 25124 Brescia - tel. 030 2290259-235;
oppure utilizzare la posta elettronica: oevr@oevr.org**

L'Osservatorio e i numeri del precedente Bollettino Epidemiologico possono essere consultati anche sul sito web <http://www.oevr.org>

Editoriale

Questo numero monografico sulla tubercolosi bovina nasce dall'opportunità di richiamare i punti fondamentali che caratterizzano questa malattia, soprattutto dal punto di vista diagnostico. Nonostante la riconosciuta esperienza sul campo, maturata quotidianamente dai colleghi veterinari che operano sia in allevamento sia al macello, non sembra fuori luogo, considerato che la tubercolosi bovina in Lombardia è ancora presente e diverse province non sono ufficialmente indenni secondo i requisiti comunitari, offrire una panoramica della malattia e ribadire alcuni aspetti dell'infezione, in particolare le dinamiche di trasmissione e di diffusione, evidenziando i pregi e i difetti dei tests diagnostici di cui disponiamo.

L'articolo è frutto di una ricerca bibliografica mirata alla selezione degli articoli più interessanti sull'argomento e la cui sintesi possa chiarire alcuni aspetti epidemiologici e diagnostici che, nella mia esperienza, i colleghi chiedono con più frequenza.

Il dato incontrovertibile emerso nell'ultimo quinquennio di bonifica sanitaria relativa alla tubercolosi bovina Lombardia è la rilevazione della malattia al macello e in minima parte con l'esecuzione della prova intradermica in allevamento. Niente di strano, trovandoci nella fase finale di un piano di eradicazione, caratterizzato da una situazione di bassa prevalenza, per cui la prova tubercolinica, seppur dotata di una elevata sensibilità, garantisce sulla "certezza" dei negativi, ma può ancora fallire nell'evidenziare tutti i positivi esistenti nella popolazione. D'altra parte, il mondo scientifico e l'esperienza maturata nei piani di eradicazione in altri Stati Membri conferma che la prova intradermica rappresenta ancora il metodo diagnostico più idoneo per sconfiggere la malattia. Questa evidenza sottolinea ancor più la responsabilità dei veterinari nella esecuzione, lettura e interpretazione della prova e negli eventuali approfondimenti diagnostici richiesti in casi di dubbio o reazioni anomale, "che non convincono", anche se non sono positive.

*Un altro aspetto fondamentale da chiarire è il ruolo dell'ispezione al macello con la sua capacità di rilevare lesioni macroscopiche a conferma di un focolaio di tubercolosi. A questo riguardo, si conferma che il gold standard per la diagnosi di tubercolosi è l'isolamento del germe, come documentato nella direttiva 97/12/CE recepita con il D. L.vo 196/99, e che la eventuale assenza di lesioni macroscopiche in animali macellati in un focolaio aperto su isolamento di *M. bovis* non mette in dubbio la diagnosi. Se di interesse, ulteriori accertamenti su pool di linfonodi senza lesioni possono essere eventualmente eseguiti per cercare di identificare gli animali ammalati tra gli NVL (no visibile lesions).*

G. Zanardi

Rassegna sulla tubercolosi bovina da *Mycobacterium bovis*

G. Zanardi¹ e C. Bonacina²

Introduzione

Mycobacterium bovis è uno dei patogeni con il più vasto spettro d'ospiti, caratterizzato da un modello epidemiologico complesso, che comprende l'interazione dell'infezione tra uomo, animali domestici e animali selvatici.

La tubercolosi bovina è una malattia cosmopolita, generalmente ad andamento cronico e caratterizzata dalla formazione di granulomi nodulari, conosciuti come tubercoli.

Definita comunemente come una malattia cronica debilitante, occasionalmente assume un decorso acuto rapidamente progressivo.

Le lesioni si presentano più frequentemente nei linfonodi, polmoni, intestino, fegato, milza, pleura e peritoneo.

Ippocrate (470-376 B.C.) fu il primo a descrivere persone che soffrivano di tubercolosi, chiamandola "phthisis", che significa consunzione; la parola "tubercolosi" fu introdotta nel 1839.

L'isolamento del germe avvenne nel 1892 per merito di Koch, ma solo nel 1911 fu chiarito che *M. bovis* può provocare nell'uomo una patologia simile a quella causata da *M. tuberculosis*, la cui denominazione risale al 1896.

Da questa scoperta si evidenziò la necessità di eradicare la malattia attraverso la predisposizione di appositi piani di profilassi.

Nel 1970 fu proposta la denominazione specifica di *M. bovis*, prima considerato come variante o tipo del *M. tuberculosis* (*M. tuberculosis* var. *bovis* o *subspecie bovis*).

Lo scopo di questo lavoro è di delineare lo stato dell'arte per quanto concerne l'agente eziologico, l'epidemiologia della tubercolosi e soprattutto l'interpretazione e il significato dei metodi diagnostici.

Agente eziologico

M. bovis appartiene alla famiglia *Mycobacteriaceae* ed è un bacillo acido-resistente, asporigeno, immobile, non cromogeno, a lenta crescita.

Con il *M. tuberculosis*, il *M. microti* (isolato da un'arvicola) e il *M. africanum* (comprendente un gruppo di ceppi responsabili di tubercolosi umana in Africa), esso è inserito in un sottogruppo distinto dagli altri micobatteri a lenta crescita. Nel 1976 fu proposto di chiamare questo sottogruppo *M. tuberculosis complex*, in considerazione della possibilità che queste 4 specie rappresentino delle varianti di *M. tuberculosis*.

La diagnosi di conferma richiede l'isolamento e l'identificazione del *mycobacterium*. Il trattamento dei tessuti e degli essudati con NaOH 2% minimizza la contaminazione. Le colonie di solito appaiono sui terreni all'uovo dopo 3-4 settimane d'incubazione a 37°C, in condizioni di micro-aerofilia. *M. bovis* è inibito dal

glicerolo e perciò i terreni di crescita ne devono essere privi. Al contrario, l'aggiunta di piruvato al terreno ne favorisce la crescita.

M. bovis non produce niacina o nitrato reductasi, è inibito dall'idrazide dell'acido thiophen-2-carbossilico e resiste alla pirazinamide.

Cavia e coniglio contraggono l'infezione generalizzata.

L'identificazione degli isolati di *M. bovis* è tradizionalmente legata alla morfologia delle colonie e alle caratteristiche della colorazione con i tests biochimici. Più recentemente si sono sviluppate tecniche rapide, che usano anticorpi monoclonali e le tecnologie DNA.

M. bovis è a lenta crescita e in sub-coltura le colonie appaiono sul terreno dopo almeno 14 giorni.

Sui terreni all'uovo le colonie tipiche sono piccole, rotondeggianti, dal color giallo pallido a color cuoio, con margini irregolari e superficie granulare. Su terreno agar sono bianche, sottili, rugose e piatte con una gibbosità centrale. I micobatteri sono descritti come acido resistenti, perché quando colorati con la carbol-fucsina resistono alla decolorazione con acido-alcool. Così colorato *M. bovis* appare come un coccobacillo o un corto bastoncino di colore rosso, con dimensioni di 0,3-0,6 µm per 1-4 µm. Nelle sezioni di tessuto e negli strisci da lesioni sono leggermente più lunghi.

Ecologia del microrganismo

Sopravvivenza nell'ambiente

M. bovis è un patogeno obbligato e nell'ambiente esterno è il più resistente fra i germi patogeni asporigeni, potendo sopravvivere per lunghi periodi in condizioni favorevoli.

Dal punto di vista epidemiologico, l'informazione che interessa è: quanto a lungo rimane infettante il microrganismo che sopravvive?

Esistono condizioni o fattori che favoriscono la sua sopravvivenza ambientale e altri che la contrastano.

Tra i primi, la disponibilità di nutrienti (materia organica) è fondamentale, poiché la loro scarsità aumenta la suscettibilità del microrganismo ai rialzi della temperatura, che ne causano la morte; anche adeguati livelli d'umidità, specialmente se l'ossigeno è disciolto nell'acqua ne favoriscono la sopravvivenza.

La luce solare diretta ha un effetto negativo sulla vitalità del germe, causandone l'essiccazione e anche i raggi UV hanno un effetto inattivante diretto, più limitato nelle zone temperate rispetto a quelle tropicali. I bassi livelli di pH e certi ioni inorganici riducono la sopravvivenza, come pure la competizione con altri microrganismi (protozoi, funghi).

I fattori che maggiormente influenzano la sua sopravvivenza nel suolo e sul pascolo comprendono la temperatura, l'umidità, il pH, l'esposizione alla luce solare, l'ossigeno disciolto, la presenza di antibiotici nel suolo, la microflora

naturale e i suoi tipi d'associazione.

Il riscontro del patogeno nel suolo e sotto-suolo è più elevato rispetto all'erba, poiché quest'ultima è più esposta all'effetto essiccante della luce solare; la persistenza di *M. bovis* in terreni trattati con residui organici raggiunge i 2 anni.

Sperimentazioni effettuate nel 1965, dimostrarono che *M. avium*, *M. bovis* e *M. tuberculosis* in feci, sangue e urine sopravvivono da 150 a 332 giorni tra 12 e 24°C, quando protetti dalla luce solare diretta. La sopravvivenza scende a 18-31 giorni tra 24 e 34°C, se esposti alla luce solare diretta.

I micobatteri sopravvivono fino a 2 anni sotterrati ad una profondità di 5 cm in suoli ombreggiati, ma solo 11-12 mesi a 1 cm di profondità. In acqua di rubinetto incontaminata a 18-24°C *M. bovis* sopravvive per 236 giorni; l'aggiunta di feci e urine allunga la sopravvivenza fino a 452-469 giorni.

Dai dati sperimentali reperiti in letteratura, sembra che la durata dell'infettività delle fonti ambientali (pascolo, urine, feci) per le specie sensibili come i bovini sia misurata in settimane piuttosto che in mesi.

In condizioni naturali, la sopravvivenza nell'ambiente esterno è inferiore rispetto a condizioni artificiali; ciò induce a pensare che la grandezza della dose minima infettante per via orale sia alta e che la presenza di deiezioni come fonte d'infezione nell'ambiente appare trascurabile rispetto agli altri meccanismi di trasmissione.

Sopravvivenza in animali infetti dopo la morte

La persistenza di *M. bovis* in animali infetti dopo la morte può rappresentare una fonte di infezione per gli animali spazzini ed eventualmente per gli animali domestici, che pascolano sui luoghi di decomposizione delle carcasse, e per le specie selvatiche che fungono da ospiti *reservoirs*.

Il termine di “*reservoir host*” è usato comunemente come sinonimo o prefisso per intendere un animale in cui l'agente infettante vive e si moltiplica normalmente e perciò rappresenta una fonte comune di infezione per gli altri animali. I *reservoirs* possono essere ospiti primari o secondari.

L'ospite primario o naturale è un animale che mantiene l'infezione in un'area endemica. Dal momento che un agente infettante è strettamente correlato all'ospite primario per la sua esistenza a lungo termine, l'ospite è anche chiamato “*di mantenimento*”.

Gli ospiti *spazzini* o *predatori* (*spillover hosts*) sono ospiti occasionali, che possono essere “*ospiti a fondo cieco*” (*dead-end hosts*), se non giocano un ruolo significativo nell'avanzamento della trasmissione dell'infezione o, all'altro estremo, possono essere “*ospiti amplificatori*” (*amplifying hosts*), che aumentano la prevalenza dell'infezione negli animali domestici o espandono il numero di specie affette dalla malattia.

L'ospite a fondo cieco o incidentale è l'animale che, di solito, non trasmette un agente infettante ad altri animali.

Il periodo in cui si può riscontrare il micobatterio in carcasse di opossum tubercolotici è legato alla velocità di putrefazione e di decomposizione, connessa alla temperatura ambiente e al grado di protezione ambientale della carcassa. Alcuni Autori sostengono che il micobatterio non è isolabile fino a quando non appaiono le lesioni tubercolari; altri sono riusciti a recuperare il micobatterio dalle interiora umide in carcasse essiccate ad almeno 1 mese dalla morte. Nello stesso studio si è evidenziato però che le

carcasse erano state danneggiate dagli spazzini in 2-3 giorni, eliminando la protezione per il micobatterio. Il riscontro del germe in carcasse di tassi tubercolotici variava da 2 settimane, nel caso in cui la carcassa permanesse sul pascolo, fino a 6 settimane, se sotterrata.

Possibile variazione nella virulenza degli isolati per le specie ospiti

La letteratura scientifica non evidenzia l'esistenza di alcuna differenza misurabile nella virulenza tra ceppi diversi di *M. bovis*, ad eccezione del ceppo artificialmente attenuato BCG. Non vi è nessuna evidenza scientifica che la presenza di infezioni da *M. bovis* in animali selvatici presenti in determinati Paesi piuttosto che in altri sia dovuta ad una selezione naturale di ceppi di *M. bovis*, adattati fisiologicamente a quell'ospite.

E' più verosimile che fattori ecologici, come la densità di popolazione delle varie specie ospite, le interazioni, le differenze di habitat, etc. siano interamente responsabili della presenza o assenza di *reservoirs* selvatici di tubercolosi in un Paese, piuttosto che un processo di specifico adattamento ad un nuovo ospite.

Resistenza dell'ospite

Non è mai stata dimostrata in modo conclusivo una resistenza genetica degli ospiti a *M. bovis*.

Esistono, peraltro, numerose osservazioni che evidenzerebbero una notevole influenza dello stato fisiologico e immunologico di un animale o persona (compreso il grado di stress ambientale), che modulerebbe il corso della tubercolosi, ma nessuna evidenza sperimentale ha confermato questa ipotesi. La trasmissione della tubercolosi nell'uomo, soprattutto in ambito familiare, è da ascrivere alle trasmissioni per aerosols infetti tramite contatto diretto, continuo e ravvicinato dei componenti del nucleo, piuttosto che ad una familiarità vera e propria.

Fattori ambientali e manageriali

I dati a disposizione, che provengono dai programmi di controllo della tubercolosi nei bovini, indicano che vi sono differenze sostanziali, sia nell'incidenza sia nella prevalenza, tra regioni geografiche diverse e tra allevamenti all'interno delle stesse regioni.

Ad esempio, l'incidenza è tipicamente più elevata negli allevamenti da latte rispetto a quelli da carne.

Tabella 1. Tempi di sopravvivenza di *M. bovis* in differenti condizioni chimico-fisiche.

Condizioni	Tempo di sopravvivenza
Putrefazione	4 settimane
Essiccamento	circa 3 mesi
Calore umido	1 minuto a 95°C
Salagione/affumicamento	oltre 1 mese
Luce solare	poche ore (diretta); 5-6 giorni (indiretta)
Formalina 10% - Cloramine 5-6% miscela di Laplace 10%	5-8 ore

Fattori ambientali e di management che possono giustificare in parte tali variazioni sono correlati a specifici fattori ecologici, che modificano il rischio di trasmissione tra ospiti o lo stabilirsi dell'infezione e della malattia, una volta che la trasmissione è avvenuta.

Le correlazioni sono chiaramente multifattoriali.

Sintesi epidemiologica corrente

La tubercolosi da *M. bovis* in Italia è una malattia controllabile ed eradicabile. L'abbattimento degli animali positivi alla prova intradermica è in grado di eliminare l'infezione negli allevamenti, a condizione che sia perseguita una stringente politica di controllo, che non permetta la persistenza dell'infezione. Questa politica elimina virtualmente tutti i meccanismi di trasmissione che non siano quelli veicolati dall'aria e che possono essere a loro volta controllati tramite una proibizione in entrata e in uscita dall'allevamento di animali infetti.

Laddove l'infezione è persistente, la causa è dovuta interamente alle procedure manageriali, che consentono la permanenza di animali infetti negli allevamenti e la loro movimentazione, con l'insorgenza di nuovi focolai di infezione. Di solito tutto ciò consegue al controllo incompleto degli animali controllabili o a movimentazioni illecite.

Non vi è nessuna evidenza che la persistenza a lungo termine dell'infezione negli allevamenti bovini o in determinate aree sia dovuta a cause inesplicabili, se non vi è la presenza di *reservoirs* selvatici.

Il fondamento dell'epidemiologia di questa malattia è lo stesso di 40 anni fa.

Nei cervi e daini allevati la situazione appare più problematica vista l'apparente elevata trasmissibilità della malattia all'interno di questa specie e poiché il test diagnostico non è così efficace come per i bovini. Inoltre, l'epidemiologia della malattia non è ancora stata ben definita come nei bovini, specialmente per quanto concerne l'importanza dei differenti meccanismi di trasmissione.

Ad ogni modo, come per i bovini, il controllo della malattia è tanto più efficace, quando tests con la massima sensibilità e specificità, sono utilizzati insieme ai dati anamnestici ed epidemiologici dell'allevamento per valutare le azioni da

intraprendere allo scopo di eradicare l'infezione.

Esistono indicazioni sulla possibilità che i cervi domestici possano trasmettere eccezionalmente l'infezione ad altre specie, interferendo nei programmi di controllo.

L'obiettivo dell'eradicazione diventa difficilmente perseguibile quando le specie selvatiche sono in grado di mantenere l'infezione in un'area in assenza di cross-trasmissione con altre specie di animali domestici o selvatici.

Lo *status* di ospite di mantenimento (*reservoir*) è stato raggiunto dal tasso, dall'opossum e varie specie di ungulati in nell'Irlanda del Nord e nelle zone a sud-ovest dell'Inghilterra, nonostante sia un evento che di regola non dovrebbe verificarsi.

Inoltre, vi sono ospiti che diffondono in altre aree, chiamati "spillover hosts", che si infettano quando il livello di contaminazione è relativamente elevato; d'altra parte, non vi è alcuna evidenza che mantengano l'infezione all'interno della propria specie, in assenza di un contatto continuo con ospiti di mantenimento infetti. L'uomo appartiene a questa categoria.

Un altro gruppo di specie (e.g. il coniglio) risulta sensibile all'infezione sperimentale, anche se in condizioni di campo non si rilevano casi naturali.

E' da sottolineare che l'equilibrio in natura tra ospiti di mantenimento e "spillover hosts" è dinamico e non statico.

All'inizio degli anni 40 l'opossum era considerato una specie sensibile, ma ora sembra probabile che la malattia si sia instaurata in Nuova Zelanda nella popolazione di opossum tra gli anni 50 e 60; la malattia sul campo fu vista per la prima volta nel 1967 e solo negli anni 70 si chiari che la specie era diventata ospite di mantenimento, sebbene indenne da infezione nella nativa Australia.

Data l'ubiquità di *M. bovis* c'è da domandarsi se in futuro si prospetta la possibilità di uno stato endemico in uno spettro mutevole di ospiti selvatici in differenti parti del mondo, con le problematiche conseguenti circa l'eliminazione dell'infezione in queste specie.

L'obiettivo del controllo sarebbe allora quello di minimizzare l'instaurarsi dell'infezione in nuove popolazioni di mantenimento e l'instaurarsi dello stato di diffusore in altre aree da specie di mantenimento in animali di rilevanza economica o ambientale e possibilmente nell'uomo.

Non vi è un singolo modo per decidere dove posizionare la specie nello spettro epidemiologico; inoltre, la situazione non è necessariamente statica.

Nel determinare l'importanza di una specie, il punto di prevalenza dell'infezione stabilito con indagini trasversali è una guida inaffidabile, se utilizzato come dato a sé stante.

Il punto di prevalenza è influenzato da due componenti:

- l'incidenza di malattia, che dipende dalle modalità di infezione con altre specie e al tasso di diffusione intra-specie;

- la durata della malattia.

L'infezione può anche instaurarsi molto tempo prima che l'animale diventi infettante (se mai lo sarà) per se stesso e per altre specie; questa evenienza indebolisce ulteriormente il dato del punto di prevalenza.

Per esempio, se gli opossum muoiono subito dopo che la malattia è rilevata, la prevalenza annuale sarà fino a 5 volte più elevata rispetto alla prevalenza stimata con un campionamento trasversale.

Tabella 2. Spettro d'ospite e potere patogeno dei micobatteri

Specie	<i>M. tuberculosis</i>	<i>M. bovis</i>	<i>M. avium complex</i>
Uomo	+++	+	-+
Bovino	+	+++	+-
Pollo	-	-	+++
Suino	+-	++	++
Coniglio	-+	++	+++
Cavia	++	+	-+
Pecora	-+	+	+
Capra	-+	+	+-
Cavallo	+-	+	+-
Cane	+	+	+-
Gatto	+-	+	-
Pappagallo	+	+	+

Per i suidi selvatici che non sono seriamente affetti dalla malattia e vivono a lungo, il punto di prevalenza può essere alto, ancorché l'incidenza può essere molto bassa e l'infezione è in un'ospite a fondo cieco.

Inoltre, i dati di prevalenza non riflettono la reale situazione quando la malattia è distribuita in clusters o raggruppata (come negli opossum), se la facilità di cattura varia tra i diversi tipi di animali o se il campionamento non considera variazioni stagionali nella prevalenza.

Il ruolo di particolari specie dipende anche da quanto a lungo sono infetti gli individui e da come si sono infettati, in funzione della via di escrezione e delle probabilità di opportunità di trasmissione verificatesi. Inoltre, l'effetto delle misure di controllo della popolazione su una particolare specie selvatica è influenzata dagli stessi temi ed anche dal fatto che, se la trasmissione avviene attraverso meccanismi multipli, le misure di controllo hanno un differente impatto sui vari segmenti della popolazione.

Modelli di trasmissione negli animali domestici e nell'uomo

Bovino

Il bovino è la specie maggiormente sensibile ed è considerato il vero ospite di *M. bovis*.

I principali *reservoirs* di *M. bovis* sono i bovini con infezioni a carico degli apparati respiratorio, digerente, urogenitale e mammario con eliminazione dei micobatteri, specialmente nei soggetti con tubercolosi aperta, caratterizzata da focolai in diretta comunicazione con l'esterno (indipendentemente dal fatto che la malattia sia clinicamente manifesta) e che possono trasmettere l'infezione a molte specie di mammiferi, compreso l'uomo. Quest'ultimo acquisisce l'infezione primariamente per ingestione di latte e suoi derivati crudi e secondariamente per inalazione.

Un animale infetto che non è prontamente rimosso dal gruppo è fonte di potenziale infezione.

La via di contagio prevalente (80-90% dei casi) è quella aerogena o respiratoria, tramite espettorato (tutti i bovini con lesioni localizzate ai linfonodi polmonari vanno considerati come possibili escretori); la maggior fonte di contagio è rappresentata da bovini affetti da tubercolosi c.d. "aperta" (organi collegati con l'esterno tramite un canale), anche senza una sintomatologia conclamata.

L'inalazione di aerosols contaminati è importante in caso di ambienti chiusi, sovraffollati e con scarsa ventilazione.

La trasmissione dell'infezione è favorita dai seguenti elementi:

- a) stretto contatto in allevamenti intensivi ad alta densità di capi;
- b) inalazione di goccioline di muco emesse con colpi di tosse e starnuti;
- c) inalazione di nuclei di goccioline (residui di piccole goccioline che si essiccano ad una dimensione tale da persistere abbastanza a lungo nell'aria e in grado di allontanarsi dalla sorgente che li ha esalati), che penetrano facilmente nei polmoni, veicolano *M. bovis* e iniziano l'infezione;
- d) polveri contaminate;
- e) saliva;
- f) scolo nasale (l'escrezione può precedere la comparsa dei sintomi clinici e si associa alla contemporanea presenza di micobatteri nelle feci)

La via orale o enterogena o alimentare si avvale

dell'ingestione di acqua o alimenti contaminati (vitello neonato alimentato con latte materno infetto; solo 1-2% delle bovine tubercolotiche presenta lesioni mammarie dovute alla diffusione ematogena); è da rilevare che occorre una dose molto elevata per l'instaurarsi dell'infezione, fino a diverse migliaia di milioni di bacilli tubercolari per infettare il vitello per via orale.

La tubercolosi mammaria comporta l'eliminazione del micobatterio nel latte prima dei sintomi clinici. L'eliminazione è intermittente e circa il 4% delle bovine infette elimina micobatteri con il latte, spesso senza presentare sintomi clinici a carico della mammella o alterazioni macroscopiche del suo secreto. La contaminazione del latte può verificarsi anche per via esogena da feci e da scolo uterino o da aerosol e polvere contaminati. Anche gli animali con tubercolosi chiusa possono essere escretori intermittenti di micobatteri.

L'escrezione fecale costituisce una modalità di trasmissione meno importante della diffusione diretta per aerosol. I micobatteri possono essere escreti con le feci tramite deglutizione del secreto polmonare arrivato in faringe con i colpi di tosse o in seguito a infezione tubercolare intestinale o epatica.

La tubercolosi congenita, contratta per via transplacentare nel 1% dei vitelli, deriva dalla localizzazione uterina dell'infezione che, tramite le vene ombelicali, arriva al feto, che manifesta lesioni al fegato e ai linfonodi portali.

Le vie di trasmissione genitale (monta), urinaria (tubercolosi renale), spermatica (infezione alla prostata e dell'epididimo), tramite scolo vaginale (tubercolosi uterina) e cutanea sono tutte di importanza secondaria.

Altre fonti primarie di contagio sono rappresentate dai ricoveri, lettieri, foraggio, acqua di bevanda, pascoli, attrezzature e autoveicoli contaminati.

Fattori di rischio nella trasmissione dell'infezione

Il sistema di allevamento intensivo, caratterizzato dallo stretto contatto tra gli animali, facilita maggiormente la trasmissione della tubercolosi bovina rispetto a quello estensivo.

Nei bovini che pascolano all'aperto, nei cervidi selvatici e nei bovini selvatici, la prevalenza della tubercolosi è solo del 1-5%, mentre nelle vacche da latte e nei cervi allevati, a causa del sovraffollamento e dell'età media di vita più lunga, il tasso di infezione può variare dal 20 al 50%.

La consistenza dell'allevamento è strettamente connessa ad una maggior possibilità di contatto diretto tra gli animali. Le condizioni igieniche scadenti sono un fattore importante per la sopravvivenza del germe nell'ambiente, mentre l'età dei bovini è direttamente proporzionale all'incidenza della tubercolosi.

I vitelli che coabitano con le vacche (specialmente nella linea vacca-vitello) sono più esposti al rischio di infezione aerogena.

La contagiosità tra animali di uno stesso allevamento è piuttosto rapida ed è favorita dal sovraffollamento, dalla stabulazione permanente, dal rimescolamento di animali di età diverse e in differenti fasi produttive, dagli abbeveratoi in comune e dagli erogatori di concentrato, che normalmente sono utilizzati da più animali.

Una breve promiscuità con animali infetti nelle fiere, nelle mostre, nei mercati o durante il trasporto, anche se di poche

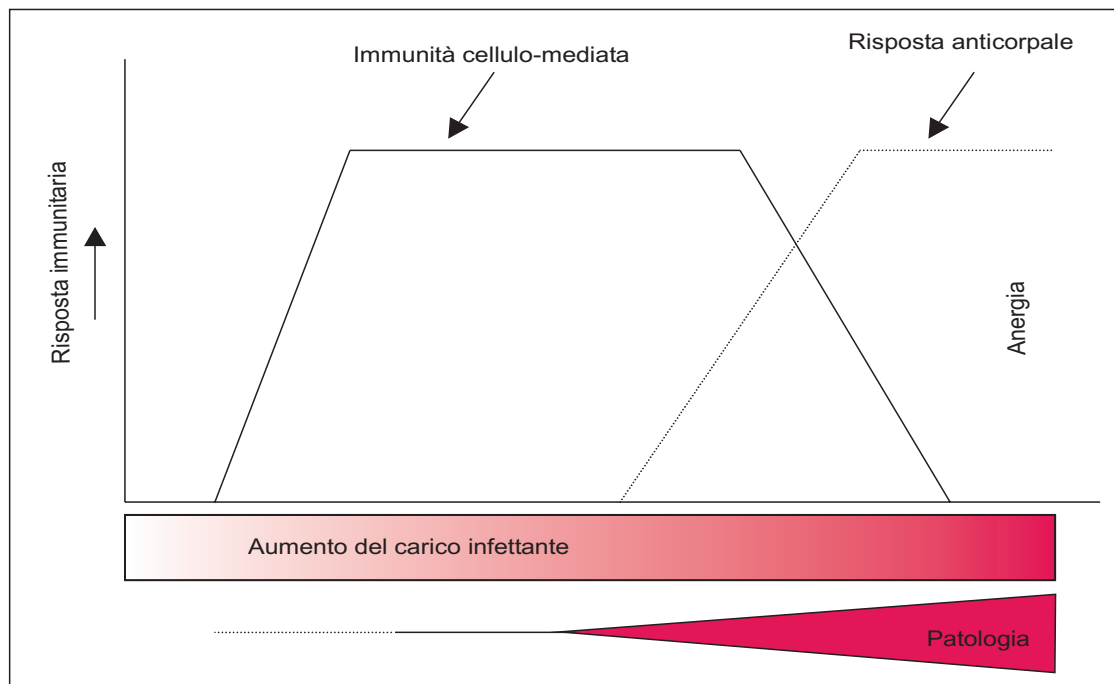


Figura 1. Diagramma dello spettro di risposta immunitaria in bovini a seguito d'infezione con *M. bovis*. La immunità cellulo-mediata si sviluppa all'inizio, con la risposta umorale anticorpale che si sviluppa con la pressione del bacillo (da sinistra a destra). Uno stato di "energia" avviene negli stadi avanzati di malattia, dove la risposta cellulo-mediata non viene rilevata. I cambiamenti patologici sono associati con l'esordio della risposta cellulo-mediata e la patologia aumenta con il progredire della malattia (da sinistra a destra). (tratto da Pollock J.M. et al. Vet. Journ. 2002).

ore, è sufficiente per il contagio.

Nelle aree indenni il bovino come fonte di contagio perde progressivamente importanza, anche se si è osservato che nei 10 anni successivi all'eradicazione si possono trovare bovini infetti anergici o ipoergici.

E' bene ricordare che le lesioni primarie a livello polmonare possono progredire rapidamente o rimanere quiescenti per molti anni e che, a differenza dell'uomo, la guarigione sembra avvenire in rari casi. Questa è una differenza fondamentale che, in pratica, fa considerare infettanti tutti i bovini IDT positivi.

Molti allevatori e veterinari considerano erroneamente che l'escrezione di *M. bovis* tramite la via aerogena avvenga principalmente ad opera di animali con evidenti lesioni polmonari.

Al contrario, gli animali ai primi stadi in cui non si sono ancora formate lesioni (no visible lesion animals) contribuiscono in maniera sostanziale alla produzione di aerosols infettanti.

Dati sperimentali indicano che esiste una correlazione esponenziale inversa tra la dose infettante in CFU e il momento della prima escrezione. In condizioni naturali alcuni autori (Neill, 1992) riscontrarono che l'escrezione comincia tipicamente dopo circa 3 mesi e in alcuni casi avviene in bovini IDT negativi.

Una volta cominciata l'escrezione "solo certi soggetti con tubercolosi agiscono come effettivi escretori e comunque in modo intermittente e in determinate circostanze".

Gli stress fisiologici e ambientali di vario genere possono agire come fattori condizionanti il periodo di escrezione di *M. bovis*.

Le evidenze scientifiche suggeriscono che la trasmissione per contatto diretto tra bovini è difficile che si instauri nei primi stadi di malattia, anche se il micobatterio può essere eliminato. La trasmissione dipende da tanti fattori, come la via d'infezione, la dose infettante, il periodo di trasmissibilità, la suscettibilità dell'ospite, e la frequenza di escrezione è solo uno tra questi.

Interazione di M. bovis con il sistema immunitario del bovino

Il ruolo dei macrofagi nella tubercolosi è ambivalente ed intrigante; essi rappresentano la linea cellulare ospite prediletta dal micobatterio e nel contempo sono le cellule chiave per il controllo e la sua distruzione.

L'interazione tra micobatterio e macrofago può essere influenzata da quella più generale tra ospite e fattori patogeni e può esitare in un'eliminazione del patogeno (sterilizzazione) tramite una risposta immunitaria innata oppure in uno stato d'equilibrio vitale.

Anche altre cellule possono essere coinvolte nelle fasi iniziali, come ad esempio le cellule natural killer, che producono il γ interferon e possono essere citolitiche, oppure i neutrofili, associati allo sviluppo del granuloma.

Nel caso in cui i micobatteri riescano a sopravvivere nei macrofagi, producendo antigeni di secrezione e prodotti dannosi, essi possono essere presentati ai linfociti T. Questa interazione dà origine alla risposta cellulo-mediata, con l'amplificazione della produzione di cellule T, all'immunità acquisita e alla memoria immunitaria.

Le osservazioni fatte in bovini sperimentalmente infettati con *M. bovis* indicano uno spettro di risposta immunitaria

come quello rappresentato in figura 1.

Come si può notare, la risposta cellulo-mediata prevale nelle forme di malattia meno avanzate e tende a diminuire con il progredire della malattia.

Un ruolo primario nella risposta cellulo-mediata è la produzione di citochine (come il γ interferon) da parte dei linfociti T, che attivano i macrofagi. Inoltre, un'altra caratteristica dei linfociti T consiste nella loro abilità nel lisare i macrofagi infetti con il micobatterio.

I linfociti B intervengono in stadi più avanzati della tubercolosi bovina e sono associati con la progressione della malattia. Ultimamente, il ruolo degli anticorpi nella protezione dalla malattia è stato rivalutato. Come rappresentato in figura 1, in condizioni d'anergia, gli anticorpi circolanti possono essere a livelli elevati con una risposta cellulo-mediata non rilevabile. Infatti, alcuni animali infetti possono non rispondere alla prova intradermica e rispondere positivamente al test del γ interferon. Questi animali possono essere nei primi stadi d'infezione e in uno stato di pre-sensibilità al test intradermico. Fra loro, alcuni γ interferon positivi sono stati poi trovati con la tipica malattia alla macellazione, ma apparentemente senza aver risposto positivamente al test intradermico nel corso degli anni. Il meccanismo per cui avviene questo fenomeno non è stato ancora indagato, anche se nell'uomo l'assenza di reattività al test cutaneo è stato associato alla mancanza di recettori sui linfociti selettivi per la cute.

Influenza della risposta immunitaria all'infezione e alla malattia

E' ormai largamente accettato che nella tubercolosi umana solo circa il 30% degli individui esposti a *M. tuberculosis* divenga infetto e di questi, il 60-90% sono in grado di contenere l'infezione senza la progressione nella malattia clinica. Questo scenario dipende dalle capacità immunitarie innate ed acquisite degli individui colpiti e che sono chiaramente influenzate sia da fattori intrinseci al micobatterio sia all'ospite.

Come nella tubercolosi bovina, l'insorgere della risposta cellulo-mediata in una infezione primaria di tubercolosi umana è associata alla formazione del granuloma tubercolare intorno al *focus* infettivo e l'influsso dei monociti/macrofagi e delle cellule T è associato ai meccanismi deputati a uccidere o inibire i micobatteri.

In molti casi, la progressione della malattia si arresta a questo stadio, ma i bacilli tubercolari possono non essere completamente eliminati. Se il granuloma progredisce e il centro del granuloma diventa necrotico (perdita della rete capillare e diminuzione dell'ossigenazione) si sviluppa il processo caseoso. Questo processo è stato classificato come ipersensibilità ritardata ed è stato descritto come efficace nel controllare la crescita dei micobatteri contenuti nelle lesioni.

Latenza

L'infezione tubercolare nell'uomo può diventare latente e persistere per molti anni senza progredire; a questo riguardo, si considera che un terzo della popolazione umana sia infetta in forma latente con *M. tuberculosis*.

Ad esempio, uno screening eseguito con il γ interferon sulla popolazione indiana ha indicato una prevalenza del 80% di

tubercolosi latente in alcune regioni.

I meccanismi responsabili della latenza non sono ancora ben compresi o chiaramente definiti.

Un possibile fattore è che, come altri batteri, i micobatteri patogeni sono in grado di esistere in uno stato dormiente o quiescente per lunghi periodi, particolarmente sotto stress.

La quiescenza crea significative difficoltà nel controllo della tubercolosi da *M. tuberculosis* in alcune popolazioni umane.

Il ruolo della latenza nella tubercolosi bovina è raramente considerato, ma potrebbe avere una importanza maggiore nella comprensione delle dinamiche della malattia. Sarebbe utile fare degli studi usando come modelli ospiti naturali come i bovini, piuttosto che piccoli animali.

La riattivazione, in alcune circostanze, è una caratteristica importante della tubercolosi umana.

Per esempio, sotto stress o in tarda età, i micobatteri possono essere meno soggetti al controllo dei sistemi immunitari dell'ospite e per analogia ciò potrebbe essere vero per i bovini.

In certe circostanze, alcuni bovini (A) hanno la capacità di resistere al challenge dell'esposizione a *M. bovis* tramite l'immunità innata o acquisita (figura 2). In molti casi questi animali sono IDT -. Alcuni, invece, pur resistendo al challenge, possono essere IDT+ a causa dello sviluppo di una risposta da cellule T di "successo". Andrebbe ricordato che tali bovini possono essere IDT+ anche per cross-reazioni da micobatteri ambientali.

Altri bovini (C) si infettano e manifestano la malattia progressiva. Di solito sono IDT+. Alcuni possono diventare anergici e non rispondere alla IDT. Altri possono non reagire alla IDT, ma essere positivi al γ interferon.

E' possibile anche che altri bovini (B) sviluppino un'efficace risposta immunitaria, associata alla presenza di micobatteri latenti, con o senza lesioni patologiche.

Questo evento è raramente preso in considerazione nella tubercolosi bovina, ma non sarebbe sorprendente che si verificasse anche per *M. tuberculosis* nella popolazione umana.

Inoltre, in trials di campo tesi a valutare il potenziale dei tests γ interferon per la rilevazione della tubercolosi bovina, si è trovato un considerevole numero di bovini con una risposta immune agli antigeni dei micobatteri in assenza di lesioni tubercolari.

Considerando le conoscenze derivate da studi sulla esposizione umana a *M. tuberculosis*, sembra probabile che la maggior parte dei bovini esposti a *M. bovis* sarebbe in grado di eliminare efficacemente i bacilli o di controllarli, possibilmente in condizioni di latenza.

Questo concetto ha significative implicazioni per il controllo della malattia e per i programmi di eradicazione.

Innanzitutto, tra i bovini con risposta immunitaria vs *M. bovis* (e.g. IDT +), ci sarà una proporzione in cui la patologia o il *M. bovis* non può mai essere rilevata, sia all'esame ispettivo *post-mortem* sia con gli esami di laboratorio.

Questi animali, IDT + e senza lesioni visibili al macello, possono essere in un numero considerevole.

Secondariamente, alcuni IDT- con infezione latente possono sottostare ad una riattivazione e allo sviluppo della malattia in certe circostanze.

Potenzialmente, questo scenario potrebbe rendere conto di una proporzione di focolai che non sono stati attribuiti ad alcuna origine d'infezione.

In certe circostanze, alcuni bovini (A) hanno la capacità di resistere al challenge dell'esposizione a *M. bovis* tramite l'immunità innata o acquisita (figura 2). In molti casi questi animali sono IDT -. Alcuni, invece, pur resistendo al challenge, possono essere IDT+ a causa dello sviluppo di una risposta da cellule T di "successo". Andrebbe ricordato che tali bovini possono essere IDT+ anche per cross-reazioni da micobatteri ambientali.

Altri bovini (C) si infettano e manifestano la malattia progressiva. Di solito sono IDT+. Alcuni possono diventare anergici e non rispondere alla IDT. Altri possono non reagire alla IDT, ma essere positivi al gamma interferon.

E' possibile anche che altri bovini (B) sviluppino una efficace risposta immunitaria, associata alla presenza di micobatteri latenti, e possano o no manifestare lesioni patologiche.

Sebbene questo evento sia raramente preso in considerazione nella tubercolosi bovina, non sarebbe sorprendente che si verificasse anche per *M. tuberculosis* nella popolazione umana.

Il numero significativo di bovini IDT+ che non mostrano evidenza di infezione all'esame ispettivo al macello o alla diagnosi di laboratorio supporterebbe, almeno in parte, l'evenienza della tubercolosi bovina.

Inoltre, in trials di campo tesi a valutare il potenziale dei tests γ interferon per la rilevazione della tubercolosi bovina, si è trovato un considerevole numero di bovini con una risposta immune agli antigeni dei micobatteri in assenza di lesioni tubercolari.

Considerando le conoscenze derivate da studi sulla esposizione umana a *M. tuberculosis*, sembra probabile che, mentre il bovino esposto a *M. bovis* può infettarsi e sviluppare la malattia, la maggior parte dei bovini esposti sarebbe in grado di eliminare efficacemente i bacilli o di controllarli, possibilmente in condizioni di latenza.

Questo concetto ha significative implicazioni per il controllo della malattia e per i programmi di eradicazione.

Innanzitutto, tra i bovini con risposta immunitaria vs *M.*

bovis (e.g. IDT +), ci sarà una proporzione in cui la patologia o il *M. bovis* non può mai essere rilevata, sia all'esame ispettivo *post-mortem* sia con gli esami di laboratorio.

Questi animali, IDT + e senza lesioni visibili al macello, possono essere in un numero considerevole.

Secondariamente, alcuni IDT- con infezione latente possono sottostare ad una riattivazione e allo sviluppo della malattia in certe circostanze.

Potenzialmente, questo scenario potrebbe rendere conto di una proporzione di focolai che non sono stati attribuiti ad alcuna origine d'infezione.

Uomo

Uno dei problemi più pressanti nel controllo della tubercolosi è la capacità del bacillo di infettare altri ospiti che non siano quelli naturali.

La trasmissione bovino-uomo avviene per via alimentare (ingestione di latte e derivati non pastorizzati), respiratoria (inalazione d'aerosol) e cutanea (ferite alle mani negli operatori di macelli e laboratori di sezionamento).

Le forme possono essere polmonari o extra-polmonari, in particolare genito-urinaria.

L'infezione dell'uomo con bacilli tubercolari bovini è causata soprattutto dall'ingestione di latte non pastorizzato o suoi prodotti come crema, formaggi freschi (47-300 giorni), burro (sopravvivenza da 20 a 100 giorni), ricotta (14 giorni) colpendo in particolar modo i bambini.

L'infezione nel bambino differisce da quella dell'adulto, poiché è molto più probabile che la disseminazione dei bacilli avvenga al di fuori dei polmoni, mentre negli adulti la più comune manifestazione è la tubercolosi polmonare.

Il consumo di carni e prodotti carnei è solo un rischio potenziale, non essendoci evidenze sperimentali. La carne e gli insaccati costituiscono un'evenienza molto rara (gli insaccati con almeno 40 giorni di stagionatura sono da escludere); specialità da consumarsi crude poco dopo la preparazione potrebbero essere contagiate

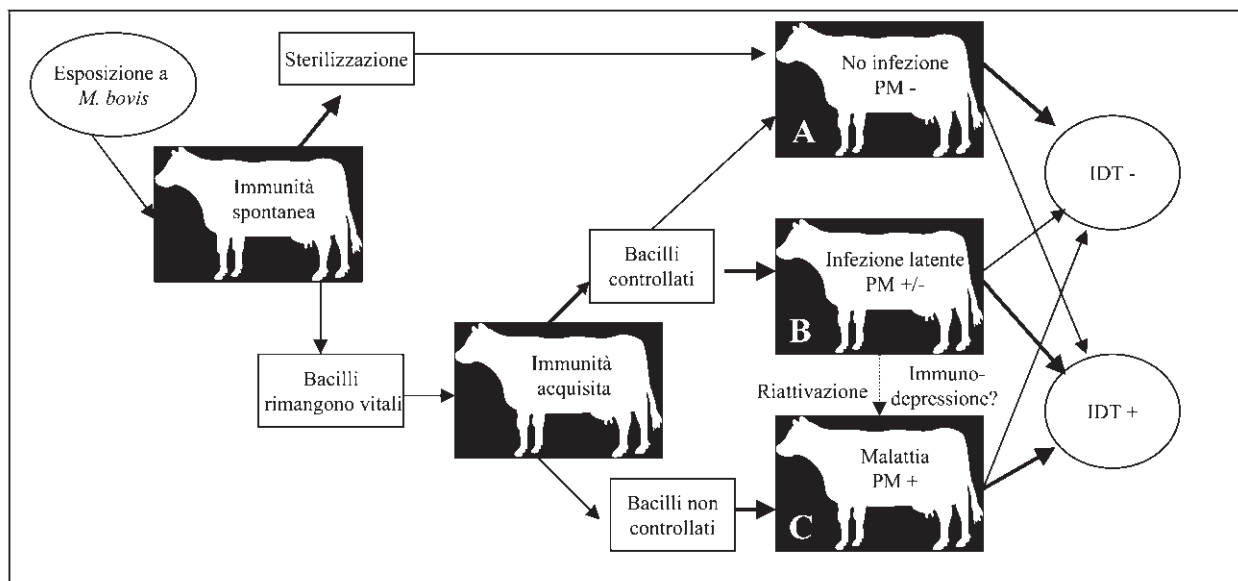


Figura 2. Diagramma che mostra i risultati più probabili derivanti dall'esposizione dei bovini a *M. bovis*. Quando sono possibili due eventi, la freccia più spessa rappresenta (arbitrariamente) l'eventualità che avviene più comunemente. PM + e indicano le rilevazioni di grosse lesioni all'esame *post mortem* e agli esami di laboratorio (tratto da Pollock J.M. et al. Vet. Journ. 2002).

Uomo

Uno dei problemi più pressanti nel controllo della tubercolosi è la capacità del bacillo di infettare altri ospiti che non siano quelli naturali.

La trasmissione bovino-uomo avviene per via alimentare (ingestione di latte e derivati non pastorizzati), respiratoria (inalazione d'aerosol) e cutanea (ferite alle mani negli operatori di macelli e laboratori di sezionamento).

Le forme possono essere polmonari o extra-polmonari, in particolare genito-urinaria.

L'infezione dell'uomo con bacilli tubercolari bovini è causata soprattutto dall'ingestione di latte non pastorizzato o suoi prodotti come crema, formaggi freschi (47-300 giorni), burro (sopravvivenza da 20 a 100 giorni), ricotta (14 giorni) colpendo in particolar modo i bambini.

L'infezione nel bambino differisce da quella dell'adulto, poiché è molto più probabile che la disseminazione dei bacilli avvenga al di fuori dei polmoni, mentre negli adulti la più comune manifestazione è la tubercolosi polmonare.

Il consumo di carni e prodotti carnei rappresenta solo un rischio potenziale, non essendoci evidenze sperimentali. L'incidenza di tubercolosi polmonare è maggiore nelle aree rurali rispetto all'ambiente urbano.

Diversi studi hanno evidenziato che il rischio d'infezione nell'uomo è correlato alla prevalenza d'infezione tubercolare nei bovini.

L'infettività di *M. bovis* per l'uomo può essere così riassunta:

- *M. bovis* è un patogeno importante per gli esseri umani;
- l'evidente diminuzione nell'incidenza della tubercolosi nei bovini ha condotto parallelamente ad una decisa riduzione dell'incidenza d'infezioni negli uomini;
- *M. bovis* è in grado di produrre molte forme di tubercolosi;
- sebbene le forme extra-polmonari di tubercolosi siano predominanti a livello statistico, si sono registrati diverse centinaia di casi di tubercolosi umana a localizzazione polmonare;
- la bovina da latte con tubercolosi è una minaccia per la salute umana.

La trasmissione uomo-bovina di *M. tuberculosis* comporta un'infezione autolimitante, con transitoria sensibilizzazione alla prova d'intradermotubercolinizzazione. Non sono riportati casi di trasmissione bovino-bovino o bovino-uomo. *M. bovis* dà origine alla forma classica di malattia. La trasmissione avviene generalmente per via respiratoria, ma vi è anche la possibilità di trasmissione con le urine (localizzazione renale), tramite contaminazione dell'ambiente d'allevamento.

Un'indagine svolta nei Paesi Bassi aveva evidenziato che in 50 allevamenti infetti con *M. bovis* con 636 capi IDT+, di cui 497 confermati *post-mortem*, 24 su 50 pazienti trovati infetti con *M. bovis* avevano tubercolosi urogenitale e avevano infettato 259 (41%) animali reattori.

In Germania, 12 pazienti infettarono 114 bovini in 16 allevamenti diversi; 9 su 12 avevano tubercolosi urogenitale e 1 di tali pazienti aveva infettato 48 bovini in 4 allevamenti diversi.

La trasmissione uomo-uomo non è stata dimostrata, se ciò fosse, l'uomo sarebbe un vero e proprio ospite di mantenimento.

In generale, si può affermare che l'uomo è un ospite accidentale di *M. bovis* e che la sua infezione dipende dalla fonte animale. L'uomo colpito da tubercolosi polmonare da *M. bovis* può trasmettere l'infezione al bovino.

Pecora

La natura dell'allevamento ovino, generalmente estensivo, e la limitata esposizione a fonti animali rende rara la malattia. Occasionalmente, prevalenze fino al 5% sono state osservate in Nuova Zelanda.

Vi è un differente modello comportamentale tra le pecore e i bovini nei confronti del tasso nelle fasi terminali della malattia, poiché le pecore evitano lo stretto contatto, essendo meno curiose dei bovini.

Capra

La prevalenza nelle capre appare bassa, anche se sono particolarmente suscettibili a *M. bovis* con manifestazione di tubercolosi polmonare e hanno la capacità di infettare il bovino.

Le capre, inoltre, possono manifestare mastite tubercolare con produzione di latte potenzialmente pericoloso per il consumatore.

Suino

Il suino rappresenta un indicatore della presenza d'infezione nel bovino, perché s'infetta generalmente tramite ingestione di latte o prodotti caseari o scarti della macellazione non bonificati.

La trasmissione intraspecifica ha un'importanza limitata, perché le lesioni restano localizzate e per la sua breve vita economica.

Cavallo

Non ha importanza epidemiologica. Le lesioni sono più frequenti a carico dei linfonodi faringei e mesenterici.

Coniglio

L'infezione sperimentale è a carattere evolutivo con morte tra 3 settimane e 3 mesi.

Cane e gatto

Ambidue le specie sono molto resistenti all'infezione.

Il cane infetto con *M. bovis* (25% dei casi, nel restante 75% da *M. tuberculosis*) può essere una potenziale fonte di re-infezione per il bovino.

L'infezione avviene per inalazione di goccioline contaminate o per il consumo di prodotti contaminati.

Il cane elimina i micobatteri con la tosse, ma anche tramite la saliva, le urine e le feci.

Nel gatto è più comune *M. bovis* (90% dei casi) e la trasmissione avviene tramite ingestione di latte o visceri contaminati. In diversi casi è stata documentata la re-infezione in allevamenti di bovini da latte.

In uno studio, 4 su 9 cani e 24 su 52 gatti esposti a bovini infetti risultarono infetti con *M. bovis* o micobatteri atipici. Ciò indica che i cani e i gatti devono essere considerati dei potenziali *reservoirs* per la popolazione bovina e perciò controllati.

In caso di depopolamento dell'allevamento, anche i cani e i gatti andrebbero abbattuti.

Cervi domestici

L'epidemiologia dell'infezione non è stata ancora del tutto chiarita. Lesioni tipiche sono a carico dei linfonodi retrofaringei, dei polmoni, dei linfonodi della cavità toracica e dei linfonodi mesenterici. Possono insorgere larghi accessi superficiali, che in casi particolari drenano all'esterno.

La localizzazione delle lesioni suggerisce che le vie di trasmissione più importanti per questa specie sono quella inalatoria e digerente.

Analogamente al bovino, la patogenesi della malattia dipende dalla grandezza della dose infettante e dalla sensibilità dell'ospite, correlata alla costituzione genetica, a precedenti esposizioni a *Mycobacterium* spp., allo stato di nutrizione, allo stato sociale nel gruppo, a stress da manipolazioni e a fattori endocrini.

Sembra che il cervo sia più infettante per altre specie che non per il bovino; è meno probabile che infetti l'uomo, se paragonato al bovino e all'opossum. In Nuova Zelanda sembra accertata la loro capacità di iniziare nuovi focolai d'infezione negli opossum.

Modelli di trasmissione negli animali selvatici

La tubercolosi nei selvatici ha molte similarità con i meccanismi di trasmissione che si verificano negli ospiti di mantenimento e da questi ad altre specie.

Sia per il tasso sia per l'opossum, il fattore chiave nel mantenimento dell'infezione nella popolazione locale è la trasmissione pseudo-verticale da madre a figlio, con disseminazione a livello locale, come risultante d'interazioni competitive tra maschi adulti, fenomeni di corteggiamento e accoppiamento tra i due sessi.

Anche per il bufalo di palude questo modello epidemiologico è sovrapponibile.

La diffusione a distanza tra popolazioni selvatiche è dovuta principalmente alla dispersione degli animali alla ricerca di nuovi areali in cui vi è cibo, oltre che al commercio di animali domestici infetti.

La trasmissione della malattia tra selvatici avviene per via aerogena e la sua eliminazione porterebbe alla riduzione e all'eliminazione dello stato di ospite di mantenimento.

Come per la tubercolosi umana, la trasmissione per contaminazione ambientale non contribuisce in modo significativo alla diffusione dell'infezione.

La trasmissione dagli animali selvatici ai domestici e tra domestici avviene prevalentemente per via aerogena e in occasione di interazioni tra un animale selvatico escretore con atteggiamenti comportamentali atipici (di solito in fase terminale di malattia) e l'animale domestico.

Il tasso rappresenta l'eccezione, perché elimina un gran numero di micobatteri con l'urina, contaminando i pascoli dei bovini.

Sembra che gli ospiti che diffondono in altre aree (spillover hosts) s'infettino più frequentemente per vie diverse da quell'aerogena, più comune negli ospiti di mantenimento (e.g. l'infezione dei predatori e degli spazzini che si cibano di animali infetti). Per definizione, questi ultimi ospiti hanno una capacità limitata di trasmettere l'infezione ad altri componenti della loro specie. Gli ospiti selvatici di mantenimento sono caratterizzati dalla loro capacità di produrre infezione all'interno della loro popolazione in modo continuo nel tempo, ma a macchia di leopardo nello spazio. Essi inducono una più bassa incidenza negli animali domestici rispetto che all'interno dell'ospite di mantenimento, con una distribuzione di infezione derivata dai selvatici che è sia temporalmente sia spazialmente a macchie, anche se l'infezione è presente in modo persistente nell'ospite di mantenimento.

La trasmissione intra e inter-allevamento dovuta a

inadeguati controlli della diffusione tra i bovini genera una distribuzione uniforme della malattia.

Il rischio che i *reservoirs* selvatici di infezione rappresentino per gli animali domestici e per l'uomo è correlato alla situazione epidemiologica tipica della specie e all'ambiente.

Esiste la possibilità di contagio da parte del bovino o dell'uomo nei confronti della fauna selvatica.

I principali *reservoirs* selvatici per *M. bovis* sono il tasso e l'opossum.

Il tasso (*Meles meles*) e il cervo in Gran Bretagna e in Irlanda mantengono l'infezione allo stato endemico.

Il primo caso di infezione nel tasso si registrò nel 1956 in Svizzera e nel 1971 fu fatta la prima segnalazione nel Gloucestershire in Gran Bretagna. Probabilmente l'infezione passò al tasso quando la prevalenza dell'infezione nei bovini era ancora alta.

Attualmente la tubercolosi è endemica nel sud-ovest della Gran Bretagna e nell'Irlanda.

Il tasso è un ospite di mantenimento ideale, perché la malattia ha un andamento cronico e l'animale può sopravvivere a lungo eliminando il micobatterio con le secrezioni polmonari, ma soprattutto con l'urina (il 37% dei tassi tubercolotici hanno la localizzazione renale ed eliminano *M. bovis* nelle urine).

La prevalenza dell'infezione fluttua da un 2 a un 12% nel corso degli anni e questa ciclicità è probabilmente causata dall'interazione della malattia con la dinamica della popolazione di tassi nell'area.

La trasmissione tra tassi (intra-specifica) avviene principalmente per via respiratoria e per via pseudo-verticale (periodo tra la nascita e l'indipendenza della prole), in minor misura con ferite da morso dovute a combattimenti fra maschi.

I tassi di solito urinano in aree ben definite dei pascoli, contaminandoli con concentrazioni molto elevate di *M. bovis*, anche se i pascoli contaminati con feci di tasso sono evitati dai bovini.

I tempi di sopravvivenza di *M. bovis* nelle urine del tasso sul terreno sono di 3 giorni in estate e 28 in inverno, perciò sembra più probabile che la trasmissione tasso-bovino avvenga per via aerogena o per contatto diretto con animali nelle fasi terminali della malattia (comportamenti anomali).

L'opossum (*Trichosurus vulpecula*), il furetto e il cervo sono i responsabili dei problemi di eradicazione della tubercolosi in Nuova Zelanda. Il furetto, caratterizzato da un odore pungente e sgradevole ha meno contatti con i bovini, mentre l'opossum, nelle fasi terminali della malattia si comporta in modo anomalo, aggirandosi barcollante nei pascoli e muore. I bovini si infettano annusando e leccando le carcasse.

Il primo isolamento di *M. bovis* nell'opossum risale al 1967 in un soggetto morto in un allevamento con persistenti problemi di tubercolosi.

La via di contagio per il bovino è il contatto diretto con animali allo stadio terminale o con carcasse infette, che possono trasmettere l'infezione anche agli spazzini (cinghiali, furetti, ermellini).

La contaminazione dei pascoli non sembra epidemiologicamente importante.

La malattia nell'opossum è progressiva e invasiva con grandi noduli tubercolari, che possono essudare all'esterno; molto comuni le lesioni polmonari, caratterizzate dalla

presenza di noduli miliari fino ad ascessi.

In condizioni di campo non sembrano frequenti l'eliminazione urinaria e fecale.

La trasmissione pseudo-verticale (fino a 5 mesi) è molto importante.

La trasmissione orizzontale tra comunità di opossum sembra legata alle attività di corteggiamento e accoppiamento tra i due sessi e alla competizione tra maschi.

Il cervo (*cervus elaphus*) è particolarmente sensibile a *M. bovis*, sviluppando lesioni a livello dei linfonodi retrofaringei, polmoni, linfonodi toracici e meseraici con formazione di ascessi, che possono fistolizzare all'esterno. Nei cervidi selvatici la malattia è sporadica, mentre in condizioni di allevamento intensivo sono molto più sensibili con aumento del rischio di trasmissione intra-specifica e inter-specifica. Il suo allevamento è sviluppato soprattutto in Danimarca, Gran Bretagna e Nuova Zelanda.

M. bovis è occasionalmente isolato anche in altre specie come il bufalo nero (*Syncerus caffer*) in Sud Africa, con tassi di infezione fino al 80%, che ha trasmesso l'infezione ai leoni (*Panthera leo*), ai cheetah (*Acinonyx jubatus*), ai kudu (*Tragelaphus strepsiceros*), ai babbuini (*Papio ursinus*) e ai rinoceronti (*Diceros bicornis*). L'alce (*cervus canadensis*), il bufalo e il bisonte nei parchi canadesi e nei Territori dell'Australia Settentrionale si infettano per via respiratoria e la malattia è endemica nella popolazione con rischio di trasmissione di infezione a bisonti e bovini indenni.

La tubercolosi nei cinghiali (*sus scrofa*) è importante per la sanità pubblica veterinaria, perché l'infezione rappresenta una potenziale zoonosi e può interferire con il controllo della malattia nei bovini. Inoltre, altre specie selvatiche suscettibili potrebbero infettarsi dai cinghiali, perpetuando la diffusione della tubercolosi nell'ambiente.

Le ipotesi sull'origine dell'infezione sono la contaminazione dei pascoli da parte di bovini escretori, l'introduzione illegale di cinghiali infetti, l'infezione del cinghiale con reflui contaminati dall'uomo.

Segnalazioni di positività in Italia sono state fatte in Liguria e nelle province di Como, Varese, Piacenza.

Sintomatologia nel bovino

I sintomi clinici sono variabili in rapporto alla via d'ingresso, all'andamento dell'infezione, all'entità delle lesioni, non soltanto in relazione alla specie, ma anche alle caratteristiche individuali dei soggetti colpiti.

Il decorso della malattia è condizionato da numerosi fattori:

- tipo, quantità e virulenza dei micobatteri;
- condizioni di reattività individuale dell'organismo (resistenza o sensibilità).

E' ormai raro riscontrare la malattia evolutiva e distruttiva e in generale i possibili sintomi correlati alla malattia, poiché la diagnosi con la IDT e l'eliminazione dei bovini reattori non consente di evidenziare le manifestazioni legate all'evoluzione della malattia.

A maggior ragione, se l'entità delle lesioni è modesta può mancare una sintomatologia conclamata e indicativa o risultare vaga e di difficile interpretazione.

Nel caso in cui la malattia tenda a progredire possono evidenziarsi sintomi di ordine generale come debolezza, dimagrimento, anoressia, temperatura sub-febbrile.

La patogenesi contempla diversi periodi di infezione:

1. Periodo dell'infezione primaria in sede polmonare (via

aerogena), faringea o intestinale (via enterogena), epatica-linfonodi periportal (via congenita). La lesione caratteristica è il complesso primario, completo o incompleto, che può evolvere a guarigione o incapsulamento e calcificazione (infezione inattiva-latente). Se l'infezione procede si può verificare la batteriemia tubercolare senza attecchimento dei micobatteri e senza reazione dei tessuti o la batteriemia con reazione dei tessuti. In particolare si sviluppa la generalizzazione precoce acuta, per continuità e contiguità attraverso le vie ematica, linfatica e intra-canalicolare, che può essere tipica al polmone, rene, fegato, meningi e atipica come la polmonite lobulare caseosa.

La generalizzazione precoce protratta è caratterizzata da lesioni a carico delle sierose, come le pleure e il peritoneo, e dei parenchimi (forme nodulari nodose). Esse possono condurre a morte o guarigione o diventare incapsulate, con infezione inattiva-latente, condurre nuovamente a batteriemia tubercolare con e senza reazione tissutale, oppure possono evolvere nel periodo post-primario o esitare nel collasso delle resistenze.

2. Reinfezione. Di origine esogena, ha lo stesso decorso dell'infezione primaria in organismi già affetti da TB, ma batteriologicamente guariti e IDT negativi.

3. Periodo post primario: manca la lesione al linfonodo ed è assente la calcificazione; s'instaura la tubercolosi cronica degli organi isolati (TB cronica evolutiva). Da un'infezione endogena (esacerbazione) o esogena (superinfezione), la lesione diffonde per vie preformate, per continuità interstiziale, per contiguità, per via intra-cavitaria (e.g. trans-peritoneale dal peritoneo all'utero; nel polmone si sviluppa una bronchite caseosa e focolai acinosi e acino-nodosi e caverne), etc.

Nei bovini non si ha guarigione e la lesione organica progredisce per lo più lentamente, ma può anche riacutizzarsi e condurre al collasso delle resistenze.

4. Collasso della resistenza. Può avvenire in qualsiasi momento dell'infezione. Si verifica la generalizzazione per via ematogena e la rapida riacutizzazione delle lesioni locali degli organi, che è chiamata generalizzazione acuta tardiva (polmonite lobulare caseificante, TB polmonare acinosa galoppante, mastite caseosa, etc.)

Le forme croniche sono proprie della prima infezione e coincidono con il complesso primario e la generalizzazione protratta; nel periodo post-primario si può realizzare la tubercolosi cronica evolutiva di organi isolati

Le forme acute sono tipiche della generalizzazione precoce del primo periodo e della generalizzazione tardiva (collasso delle resistenze). E' possibile l'evenienza di forme croniche riacutizzate.

La sintomatologia clinica è strettamente legata alla sede della lesione e al decorso.

Le forme acute (miliare acuta da generalizzazione precoce del primo periodo e generalizzazione tardiva del collasso della resistenza) sono causate dall'ingresso di micobatteri nel circolo sanguigno, ad ondate continue o successive, con la formazione di tubercoli disseminati in tutti gli organi.

La condizione affinché s'instauri la forma acuta è che l'organismo ospite si trovi in uno stato preallergico, normoergico, ipoergico, anergico.

L'insorgenza della tubercolosi miliare non dipende solo

dall'irruzione dei micobatteri, ma soprattutto dallo stato di resistenza organica dell'animale infetto (in un animale iperergico, la batteriemia non esiterebbe in una forma miliare e decorrerebbe asintomatica).

La gravità della forma miliare dipende dallo stato della difesa organica, dalla carica batterica ematica e dalla virulenza dei germi.

La forma miliare acuta ha un quadro clinico complesso e può decorrere con i sintomi di una grave setticemia: temperatura febbrile elevata (41°C) e continua, abbattimento, anoressia, marcata dispnea e imponente enfisema polmonare, rapido dimagrimento, esito rapidamente mortale.

E' una sintomatologia che può essere confusa con forme influenzali e la diagnosi solitamente è emessa sul reperto necroscopico.

Le forme tipiche del collasso delle resistenze sono caratterizzate da sintomi di ordine generale (depressione del sensorio, disoressia, temperatura febbrile continua) e sintomi corrispondenti alle lesioni degli apparati interessati. Ad esempio, nel polmone (processo di caseificazione di più lobuli vicini) noteremo soffio tubario, rantoli e sibili, tosse spontanea e provocabile, dispnea intensa con inspirazione intercisa e discordante, pleurodinia.

Il coinvolgimento dei linfonodi, che avviene specialmente nella generalizzazione precoce, può provocare respiro russante (l. retrofaringei), pseudopericardite (l. mediastinici anteriori), meteorismo ricorrente (l. mediastinici posteriori), disfunzioni intestinali e dimagrimento (l. meseraici).

Le forme croniche riacutizzate si caratterizzano per la compromissione dello stato generale con lento e progressivo dimagrimento, temperatura sub-febbrile o febbre intermittente, sintomi particolari legati alla sede delle lesioni.

Ad ogni modo, i segni variano secondo la distribuzione dei tubercoli nell'organismo e con poche eccezioni il decorso della malattia è cronico. In molti casi, i sintomi mancano anche negli stadi più avanzati della malattia. L'interessamento dei polmoni si può manifestare con la tosse, che può essere indotta da cambiamenti di temperatura o con pressione manuale sulla trachea o con dispnea.

In casi avanzati, i linfonodi sono spesso ipertrofici e possono ostruire il passaggio dell'aria, del tratto alimentare o dei vasi sanguigni. I linfonodi della testa e del collo possono essere visibili e talvolta rompersi e drenare.

Il coinvolgimento del tratto digestivo può esitare in diarrea intermittente e costipazione in qualche caso.

L'estrema emaciazione e lo stress respiratorio acuto possono presentarsi negli stadi terminali.

Le lesioni che interessano il tratto genitale possono insorgere nel caso in cui l'infezione primaria dell'utero avvenga in seguito alla copertura con un toro infetto o con la F.A. con seme infetto. I genitali maschili sono raramente coinvolti; comunque, quando sono presenti lesioni al pene, esse appaiono limitate alla sottomucosa del glande del foderò e dei vasi linfatici adiacenti.

Diagnosi

La sensibilità e la specificità di un test non subiscono variazioni in relazione alla malattia presente nella popolazione. La sensibilità di un test è la proporzione di animali positivi al test tra quelli realmente ammalati; più bassa è la sensibilità, più alta sarà la proporzione di falsi

negativi.

La specificità di un test è la proporzione di animali negativi al test tra quelli realmente sani (non malati); più bassa è la specificità, più alta sarà la quota di falsi positivi.

Altri parametri sono i valori predittivi che, a differenza dei parametri di accuratezza di un test (sensibilità e specificità) sono influenzati dalla prevalenza della malattia in esame.

Il valore predittivo risponde alla domanda: se il risultato di un test è positivo, quante sono le probabilità che il soggetto sia affetto dalla malattia? Oppure, se il risultato di un test è negativo, quante sono le probabilità che il soggetto sia esente dalla malattia? E' un processo logico di inferenza inversa.

Regola da tenere sempre a mente è che il valore predittivo positivo di un test offre una stima della probabilità di essere realmente affetti da malattia (secondo la classificazione definita dal gold standard), se il test (o valutazione clinica) indica lo stato di malattia. Il valore predittivo positivo varia con il variare della prevalenza della malattia sotto indagine: a parità di sensibilità e specificità del test, il valore predittivo positivo diminuisce se la prevalenza diminuisce.

D'altra parte, il valore predittivo negativo di un test offre una stima della probabilità di non essere realmente affetti da malattia (secondo la classificazione definita dal gold standard), se il test (o valutazione clinica) non indica lo stato di malattia. Anche il valore predittivo negativo varia con il variare della prevalenza della malattia sotto indagine: a parità di sensibilità e specificità del test, il valore predittivo negativo aumenta se la prevalenza diminuisce.

Diagnosi post mortem

Il riscontro di lesioni tipiche durante la necropsia rappresenta un momento importante nella diagnosi di tubercolosi bovina, che va sempre confermata con l'isolamento *M. bovis* da parte del laboratorio. Una diagnosi presuntiva può essere fatta con l'isto-patologia, ma la diagnosi definitiva consiste nell'isolamento di *M. bovis*. L'isolamento e l'identificazione di *M. bovis*, però, richiedono tempo; sono necessarie almeno 12 settimane per essere sicuri della negatività. La diagnosi istologica in aree ad elevata prevalenza può essere soddisfacente, ma non può essere applicata in tutte le situazioni.

Nei primi stadi dei programmi di controllo della tubercolosi, quando la prevalenza è alta, grande affidamento può essere posto sulla diagnosi di tubercolosi basata sulla rilevazione di lesioni macroscopiche durante l'esame *post mortem*. Quando la frequenza della malattia è alta, raramente è richiesta l'esame culturale e il costo della diagnosi fallace è trascurabile. Quando la prevalenza di malattia è bassa, durante gli ultimi stadi di una campagna di eradicazione, la necessità di una diagnosi definitiva diventa più importante e l'esame culturale di routine va fatto su tutte le lesioni sospette. Verso la fine dell'eradicazione è importante determinare il vero stato dei reattori alla tubercolina, specialmente quando non si trovano lesioni macroscopiche (i cosiddetti reattori NVL = No Visible Lesion) e l'esame culturale dei tessuti di tali animali è necessario per chiarire il loro stato sanitario.

Le lesioni tubercolari rilevabili all'esame *post mortem* sono la conseguenza dell'invasione tissutale da parte del micobatterio e testimoniano gli ultimi stadi del processo della malattia piuttosto che il processo infettivo; per questa

ragione esse non possono essere utilizzate per stimare l'età dell'infezione.

I cambiamenti patologici che sono identificati sono spesso confinati a lesioni localizzate in un polmone e/o linfonodo, che riceve linfa da una porta di entrata dell'infezione, respiratoria o digerente (complessi primari completi/incompleti). Questo ha un peso nell'efficienza della diagnosi o nella conferma di bovini reattori alla tubercolina; infatti, fino al 53% delle lesioni possono non essere rilevate a questo stadio. A questo proposito, bisogna tenere in considerazione la bassa sensibilità dell'esame *post mortem* condotto in condizioni routinarie al macello.

In effetti, il "gold standard" per la tubercolosi nel bovino è di sotto all'ottimale e questo è un serio impedimento alla valutazione soddisfacente dei tests diagnostici, incluso quello tubercolinico.

Il test tubercolinico funziona bene come screening, ma fornisce solo un'evidenza retrospettiva dell'esposizione all'infezione.

La necropsopia finalizzata all'esame dei bovini che reagiscono alla tubercolina può essere eseguita ricercando lesioni macroscopiche nei tessuti oppure, raccogliendo in modo asettico i tessuti intatti (linfonodi) per un successivo esame dettagliato in laboratorio. La prima procedura comporta diversi tagli paralleli del linfonodo *in situ*, allo scopo di rilevare lesioni macroscopiche ed è efficace quando la tubercolosi è endemica e la prevalenza della malattia è alta. L'infezione può essere confermata dall'esame culturale. La seconda procedura si esegue in associazione con la raccolta asettica di tessuti per l'esame batteriologico. Lo scopo della raccolta asettica è di prevenire o minimizzare la contaminazione dei tessuti con suolo e feci, che possono contenere micobatteri atipici e altri microrganismi in grado di coprire e sovrastare la crescita di *M. bovis*, e confondendo la diagnosi.

In questo caso i linfonodi non sono tagliati a fettine, ma liberati dal grasso circostante, lasciando intatta la capsula linfonodale, che contrasta la contaminazione. Questa procedura è usata quando l'esito della necropsopia ha conseguenze sanitarie a livello d'allevamento o di regione, il reattore proviene da un allevamento nelle fasi finali d'eradicazione, in cui non vi è un'anamnesi sufficiente d'allevamento o dove la sensibilizzazione alla tubercolina si pensa causata da altro (falsa positività).

L'esame necroscopico per la rilevazione di lesioni tubercolotiche nei bovini deve essere completo e tutti i tessuti elencati in tabella 1 dovrebbero essere identificati ed esaminati. Un reattore in cui non sia rilevata alcuna lesione visibile non può legittimamente essere chiamato un falso positivo o un reattore NVL, finché tutti i tessuti elencati non siano stati completamente esaminati. La via principale d'infezione nel bovino è quella inalatoria e poiché la tubercolosi è una malattia che colpisce il sistema reticolo-endoteliale, le lesioni possono trovarsi nei linfonodi, virtualmente in ogni distretto anatomico, di qui la necessità di esaminare un gran numero di linfonodi.

Al fine di ottimizzare la procedura dell'esame *post mortem*, in uno studio australiano è stata determinata la distribuzione delle lesioni in 374 bovini tubercolotici. Le lesioni furono rilevate usando una necropsopia dettagliata, in cui furono esaminati tutti i tessuti elencati in tabella 1.

I dati riassunti in tabella 2 evidenziano i tessuti identificati come essenziali per rilevare i tubercoli. Nel bovino con una singola lesione di tubercolosi (il 66% hanno una sola lesione), la ricerca ha evidenziato che l'86% poteva essere identificato con l'esame di solo tre paia di linfonodi (mediastinici, retrofaringei mediali e bronchiali) e dei polmoni. L'esame di tre ulteriori paia di linfonodi (parotidei, cervicali caudali e inguinali superficiali) e dei linfonodi mesenterici aumentava la capacità di rilevazione del 95%

Tabella 3. Tessuti da esaminare per presenza di lesioni in bovini che reagiscono al test tubercolinico

Testa	Ln mandibolare, destro e sinistro
	Ln parotideo, destro e sinistro
	Ln retrofaringeo mediale, destro e sinistro
	Ln retrofaringeo laterale, destro e sinistro
	tonsille
Torace	Ln mediastinico, anteriore e posteriore
	Ln tracheobronchiale (bronchiale), destro e sinistro, craniale e mediale
	polmoni
Addome	Fegato
	Ln epatico
	Milza
	Ln mesenterico lungo l'intera lunghezza del tratto gastro-intestinale
	Reni
Carcassa	Ln cervicale caudale (prescapolare), destro e sinistro
	Ln subiliaco (prefemorale), destro e sinistro
	Ln iliaco interno, destro e sinistro
	Ln iliaco mediale, destro e sinistro
	Ln iliaco laterale (inguinale profondo), destro e sinistro
	Ln gluteale (ischiatrico), destro e sinistro
	Ln sacrale, destro e sinistro
	Ln inguinale superficiale (sopramammario o scrotale), destro e sinistro
	Contenuto della mammella o dello scroto e vescicole seminali

degli animali con lesioni.

Poiché più di un granuloma può essere svelato simultaneamente in un animale, per eseguire una diagnosi corretta basta confermare dal punto di vista batteriologico non più di tre lesioni.

Se una lesione è troppo piccola da dividere, si dovrebbe dare la preferenza alla raccolta per l'esame batteriologico.

I reattori NVL possono essere riscontrati ogniqualvolta un animale è testato. La mancanza di lesioni visibili potrebbe essere dovuta a svariate ragioni: per esempio, potrebbero essere presenti e non osservate, poiché l'animale può essere negli stadi iniziali di infezione, quando le lesioni sono troppo piccole da vedere ad occhio nudo, oppure la sensibilizzazione alla tubercolina può essere causata da altri micobatteri, che non siano il *M. bovis*.

Il significato dei reattori NVL varierà con la storia dell'allevamento. In allevamenti dove si trovano bovini con lesioni, i reattori NVL sono di scarso significato. Il reale significato dei reattori NVL è quando non vi sono reattori con lesioni in un allevamento.

I reattori NVL non dovrebbero essere classificati come "non infetti", poiché potrebbero essere infetti con *M. bovis*. Il numero di infetti varierà con la prevalenza di *M. bovis* nei bovini testati. La prevalenza di reattori NVL con colture positive può arrivare fino al 10%. Quando le lesioni non si trovano in un reattore la situazione deve essere chiarita con l'esame batteriologico. I tessuti che dovrebbero essere raccolti per la coltura sono quelli che più frequentemente contengono le lesioni (tabella 2).

Confronto tra l'ispezione al macello e la necropsia dettagliata per la rilevazione di grosse lesioni

Il grado di sensibilità della necropsia nel rilevare le lesioni dipende dal tempo a disposizione e dalla diligenza degli operatori che conducono l'esame. Durante l'ispezione *post mortem* al macello, il principale interesse degli ispettori è l'idoneità della carne al consumo umano, non la rilevazione di tutti i bovini ammalati. Idealmente, un'attenta ispezione *post mortem* dei tessuti appropriati dovrebbe rilevare il 95% delle lesioni presenti in una carcassa.

In uno studio, sono state paragonate la frequenza e la distribuzione delle lesioni tubercolari in 113 bovini reattori alla tubercolina provenienti da un allevamento infetto e allocati in modo random ad uno dei due metodi d'esame.

25 furono esaminati con un'ispezione *post mortem*

dettagliata delle tonsille, polmoni, fegato, milza e reni; i linfonodi elencati in tabella 1 furono raccolti per un successivo esame macroscopico in laboratorio. Solo tre linfonodi mesenterici, scelti in modo random dal piccolo intestino, furono raccolti per l'esame di laboratorio. I rimanenti 88 reattori furono soggetti all'ispezione *post mortem* di routine.

Presupponendo l'equivalenza delle due tecniche, si sarebbero attese proporzioni eguali di lesioni in ciascun gruppo; fu trovata una marcata disparità tra i risultati dei due sistemi di approccio diagnostico.

La procedura di ispezione *post mortem* di routine aveva rilevato circa il 47% delle lesioni riscontrate con l'esame dettagliato. Le ragioni del tasso inferiore di rilevamento al macello possono essere messe in relazione al modo di esaminare.

Le lesioni più piccole possono andar perdute a livello di macelli industriali, perché c'è un tempo limitato a disposizione per l'esame di ciascun tessuto e il taglio sottile dei linfonodi *in situ* è molto difficile. Pertanto, si può concludere che l'ispezione al macello ha una bassa sensibilità, ciononostante è un metodo efficiente per monitorare lesioni tubercolari in un gran numero di bovini.

Identificazione

L'identificazione degli isolati di *M. bovis* è tradizionalmente legata alla morfologia delle colonie e alle caratteristiche della colorazione con i tests biochimici. Più recentemente si sono sviluppate tecniche rapide che usano anticorpi monoclonali e le tecnologie DNA. *M. bovis* è a lenta crescita e in subcoltura richiede minimo 14 giorni affinché le colonie appaiano sul terreno.

Sui terreni all'uovo le colonie tipiche sono piccole, rotondeggianti, dal color giallo pallido a color cuoio, con margini irregolari e superficie granulare. Su terreno agar sono bianche, sottili, rugose e piatte con un cumulo centrale. I micobatteri sono descritti come acido resistenti perché quando colorati con la carbol-fucsina resistono alla decolorazione con acido-alcool. Così colorato *M. bovis* appare come coccobacillo rosso o corto bastoncino, 0,3-0,6 µm per 1-4 µm. Nelle sezioni di tessuto e negli strisci da lesioni sono leggermente più lunghi.

Vi sono diversi tests biochimici per *M. bovis*, il più usato è la suscettibilità all'idrazide del 2-tiofene carbossilico (TCH) e all'isoniazide, che impiegano 3-4 settimane per completarsi.

Tabella 4. Localizzazione dei tessuti più frequentemente colpiti nel bovino da lesioni singole di tubercolosi.

Tessuto	% di bovini rilevati con lesioni
Ln retrofaringeo (destro e sinistro)	29,4
Ln mediastinico (anteriore e posteriore)	28,2
Ln bronchiale (destro e sinistro)	18,0
Polmoni	9,8
Ln mesenterico	2,9
Ln parotideo (destro e sinistro)	2,4
Ln cervicale caudale (destro e sinistro)	2,4
Ln inguinale superficiale (destro e sinistro)	1,2
Proporzione di tutti i bovini con lesioni singole che sono stati scoperti	94,3

Le tecniche d'identificazione convenzionali richiedono una buona crescita su terreni artificiali e impiegano dalle 3 alle 4 settimane per completare l'isolamento primario. Recentemente, l'identificazione rapida degli isolati di *M. bovis* è stata facilitata dallo sviluppo di tecniche immunologiche (anticorpi monoclonali) e sonde DNA (PCR). Queste tecnologie consentono una rapida identificazione dei membri del *Mycobacterium tuberculosis complex* (MT complex) che include *M. bovis*, in meno di un giorno, ma c'è ancora bisogno d'isolati da sottoporre ai tests convenzionali biochimici a conferma della loro identità a livello di specie.

L'identificazione di *M. bovis* tramite l'uso di anticorpi monoclonali si esegue partendo da grandi colonie o da crescita batterica raschiata da un isolamento primario; i risultati dell'identificazione sono disponibili in 2-3 ore.

L'identificazione genomica sfrutta il saggio Spoligotyping, basato sul polimorfismo del locus DR (short repetitive direct repeats), presente nel genoma di tutti i micobatteri appartenenti al MT complex; i patterns 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.

L'analisi Spoligotyping permette di:

- identificare *M. bovis* all'interno del MT complex;
- differenziare all'interno della specie *M. bovis* la sottospecie *caprae*;

- ottenere una preliminare differenziazione genetica dei ceppi isolati di *M. bovis* confrontabile, dove possibile, con banche dati degli spoligotipi presenti in altri paesi europei.

Poiché il 40% dei ceppi appartiene allo spoligotipo BCG-like, è necessario migliorarne la capacità diagnostica differenziativa.

Il suggerimento di alcuni Autori è di utilizzare lo spoligotyping come rapido screening iniziale dei ceppi di *M. bovis*, affiancandolo con altri metodi di sub-tipizzazione maggiormente informativi, come l'analisi VNTR (Variable Number Tandem Repeat), una tecnica di sequenziazione genomica di particolari loci ripetuti a tandem del ceppo, in grado di identificarlo.

Valutazione sul campo dei tests per la tubercolosi bovina

La misurazione della sensibilità e specificità dei tests diagnostici presuppone l'accurata determinazione dello stato d'infezione di tutti gli animali usati nella valutazione. La procedura usata per identificare gli animali ammalati deve essere indipendente dal test che si sta valutando.

Per esempio, nella valutazione dei tests diagnostici per la tubercolosi bovina non è appropriato valutare il γ interferon usando come criterio per la diagnosi di malattia i risultati della prova intradermica, poiché basata su un altro test d'immunità cellulo-mediata.

Per la tubercolosi la sola alternativa a un test per l'immunità cellulare, che sia sufficientemente sensibile, è l'esame batteriologico. La diagnosi definitiva di tubercolosi bovina è l'isolamento di *M. bovis*. Questo è il miglior "gold standard" da usare nella valutazione di qualunque test diagnostico.

Per la valutazione del γ interferon, Wood et al. (1991, 1992) usarono la conferma batteriologica dell'infezione come criterio di malattia, poiché indipendente dallo stato di malattia.

Vi sono 4 punti critici da tenere in mente quando si progettano trials per valutare i metodi diagnostici:

1. gli animali da includere nei trials devono essere selezionati in maniera random. Perciò, per evitare bias dovrebbero essere usati allevamenti interi o gli animali possono essere selezionati in maniera random dalla popolazione in studio;
2. tutti gli animali dovrebbero essere testati contemporaneamente per evitare la possibilità che un test interferisca con l'altro, se i due tests si stanno confrontando sullo stesso animale. Ad esempio, valutare il γ interferon quando si sa che la prova intradermica influenza i titoli nel test;
3. tutti i reattori al test in valutazione dovrebbero essere soggetti ad un esame *post mortem* dettagliato e ad un esame batteriologico. Come minimo, i tre tessuti più frequentemente infetti, i linfonodi mediastinici, bronchiali e retrofaringeo mediale, andrebbero raccolti in modo asettico per l'esame batteriologico;
4. tutti i bovini non reattori dovrebbero essere esaminati *post mortem*.

Per ragioni pratiche ed economiche, ciò si può realizzare passandoli al macello e sottoponendoli all'ispezione *post mortem*. Se la procedura ispettiva impiegata può essere migliorata, ad esempio, dedicando più tempo per l'esame di ciascuna carcassa e aumentando la gamma di tessuti esaminati, l'efficienza della procedura dovrebbe giungere a livelli accettabili di sensibilità.

Molti dei trials progettati per valutare tests diagnostici per tubercolosi non sono stati condotti in modo appropriato ed è ora molto difficile trarne valide conclusioni. I motivi dell'invalidità dei risultati in questi trials sono i seguenti:

- interazione tra i tests: diversi tests cutanei erano eseguiti contestualmente sullo stesso animale;
- gli animali erano selezionati dalla popolazione applicando prima un altro test;
- lo stato di malattia dei reattori era basato solamente sulla presenza di lesioni rilevate usando procedure non sensibili, per esempio quelle dell'ispezione di routine *post mortem* al macello;
- non tutti i bovini usati nei trials erano esaminati *post mortem*, cioè i bovini che non reagivano non erano uccisi o non erano esaminati alla macellazione.

Ciò premesso, la sensibilità della IDT singola è di 0,85 e la specificità di 0,995.

La sensibilità è stata stabilita sulla base delle lesioni trovate all'ispezione routinaria *post mortem* al macello di bovini reattori provenienti da allevamenti soggetti a restrizioni.

La specificità è stata calcolata sulla base dei ritoveramenti in allevamenti giudicati essere indenni da tubercolosi in accordo con la loro anamnesi nel monitoraggio.

La sensibilità aumenta a 0,93, quando è applicata un'interpretazione più severa, anche se vi è una certa perdita di specificità.

La sensibilità del γ Interferon, dedotta dai risultati di un'indagine condotta su 6.800 bovini in allevamenti problema, è di 0,84-0,87, mentre la specificità (calcolata su 2.000 animali indenni) è circa 0,97.

La sensibilità è paragonabile alla IDT, ma più bassa; vi sono, in ogni modo, sub-popolazioni di bovini infetti con *M. bovis* che danno reazione positiva al γ Interferon e non all'IDT e *vice versa*. Usati in parallelo, cioè contemporaneamente, i

due tests combinati danno una sensibilità superiore al 90%. La specificità del test γ Interferon (97%) è più bassa dell'IDT (99,9%) e questo preclude l'uso del test come alternativa all'IDT a scopi di screening.

L'applicazione del test γ Interferon è perciò confinata a controllare situazioni in cui vi è un'alta probabilità che i bovini in allevamento siano infetti con *M. bovis*. L'utilizzo in parallelo dei due tests in questi casi diminuisce il tempo necessario a eradicare l'infezione ed è particolarmente utile per favorire la decisione del depopolamento.

Il test ELISA è eseguito sui campioni di sangue prelevati per la brucellosi.

Al contrario del test γ Interferon e della IDT, esso misura la risposta anticorpale all'infezione da *M. bovis*.

Questa risposta, di solito, emerge più tardi e dura più a lungo della risposta cellulo-mediata.

Il test ELISA è utilizzato per rilevare bovini infetti che sono anergici alla IDT. A questo scopo i campioni di sangue sono prelevati dai non reattori alla IDT, due settimane dopo la prova intradermica.

La sensibilità del test ELISA è del 80%, mentre la specificità rimane intorno al 50%.

L'applicazione del test è confinata ad allevamenti sicuramente infetti, in cui la presenza di uno o più animali anergici è sospettata e particolarmente nei casi in cui l'infezione è confinata in specifici settori dell'allevamento. Anche in questo caso il suo uso è indicato per accelerare il processo di eradicazione della malattia e per favorire il depopolamento.

La sorveglianza attiva al macello in Lombardia nell'ultimo quinquennio.

Nei primi 10 mesi del 2004 in Lombardia sono stati notificati 18 focolai di tubercolosi, di cui 12 verificatisi in aziende di riproduzione da latte e 6 in aziende da riproduzione linea vacca-vitello.

La sorveglianza attiva al macello ha evidenziato 10 allevamenti successivamente confermati positivi alla IDT e con l'isolamento di *M. bovis*. Fra i restanti 8 allevamenti focolaio, 4 sono stati evidenziati con la prova intradermica eseguita in seguito a segnalazione di correlazione epidemiologica con focolai aperti nell'ambito della sorveglianza al macello e 4 con la prova intradermica, di cui una eseguita prima della movimentazione degli animali verso un'altra azienda (pre-moving test) e 3 in occasione della prova annuale di risanamento.

La distribuzione territoriale dei focolai di tubercolosi bovina emersi in Lombardia nel 2004 è visualizzata nella figura 3.

Si può notare che la provincia di Lodi conferma di essere un territorio problematico per l'eradicazione della malattia, anche se è da notare che i focolai emersi sono tutti attribuibili a re-infezioni, dovuti alla persistenza dell'agente eziologico negli allevamenti già sede di focolaio negli anni passati e risanati con il ricorso all'abbattimento selettivo.

I 2 focolai nella provincia di Bergamo sono secondari e sono collegati ad un'azienda positiva nella provincia di Milano, che aveva ospitato e alimentato gli animali in promiscuità con i propri nel periodo invernale.

Nella provincia di Brescia sono stati denunciati 4 focolai, 2 secondari in Valcamonica, collegati per alpeggio in comune con un'azienda focolaio di fine 2003, uno primario in Valcamonica infettatosi per introduzione illecita di animali e

uno primario in Valtrompia, rilevato nel periodo dell'alpeggio.

Destano attenzione e preoccupazione i 3 focolai emersi nella provincia di Sondrio nei comuni di Traona e di Ardenno, nella parte bassa della valle, poiché lo stato d'indennità da tubercolosi bovina nella provincia è acquisito dal 1967 e le prove di risanamento si svolgono a cadenza biennale. La tipizzazione genomica con il metodo VNTR dei ceppi isolati nella provincia di Sondrio rileva la loro peculiarità rispetto agli altri isolati della Lombardia.

Alcune considerazioni non nuove emergono dalla situazione sanitaria del 2004:

- la sorveglianza attiva al macello con segnalazione di lesioni tubercolari in animali regolarmente macellati si conferma una potente misura per eradicare la tubercolosi bovina;

- l'eradicazione della tubercolosi bovina non può prescindere dall'applicazione dello stamping out, come rappresentato dalla situazione in provincia di Lodi, in cui gli abbattimenti selettivi operati nel passato non hanno portato all'eradicazione della malattia, al contrario la stanno riportando alla luce negli stessi allevamenti già sede di focolaio;

- l'esecuzione della prova intradermica sugli animali prima della loro commercializzazione (pre-moving test) è efficace e complementare alla prova di risanamento annuale;

- l'origine più frequente dei focolai, accanto alla già citata re-infezione a distanza anche di diversi anni degli animali in allevamenti solo apparentemente risanati, è l'introduzione di animali.

Per quanto concerne il test intradermico, la constatazione di una certa fallanza nel rilevare la maggior parte dei focolai emersi, induce a interpretare in modo severo la lettura della prova, aumentandone la sensibilità, con l'evidenziazione e la gestione in sede di approfondimento diagnostico di reazioni dubbie, al fine di evidenziare situazioni a rischio, soprattutto se l'allevamento è già stato segnalato in passato per animali con lesioni tubercolari al macello o è già stato sede di focolaio.

In alcuni focolai la diffusione dell'infezione tra gli animali dell'allevamento è repentina, con stadi evolutivi diversi evidenziati all'esame necroscopico; di solito, si trovano alcuni animali con un quadro di generalizzazione precoce protratta o tardiva e un gran numero di capi con complessi primari incompleti o completi. L'anamnesi remota dell'allevamento può evidenziare passate positività o casi dubbi, che, sottoposti a macellazioni conoscitive, non erano stati confermati positivi.

In questi casi il rischio è di sottostimare l'importanza di reazioni cutanee anomale pur entro i limiti di interpretazione negativa. L'esame ispettivo *post mortem* di animali dubbi o positivi, se negativo, non garantisce di per sé l'indennità dalla malattia, che solo l'esame batteriologico degli organi e linfonodi prelevati è in grado di confermare.

In alcuni casi, la prevalenza di infezione negli allevamenti focolaio è contenuta e relativa a pochi animali (di sotto al 20% della popolazione a rischio), con lesioni *post mortem* riferibili a complessi primari incompleti; questo quadro porta ad ipotizzare che l'infezione sia di recente introduzione o sia rimasta in fase di latenza in alcuni animali, che, in concomitanza con eventi stressanti (e.g. parto), iniziano ad eliminare il micobatterio.



Figura 3. Distribuzione dei focolai in Lombardia al 31 ottobre 2004

Conclusioni

I metodi tradizionali della prova intradermica, dell'ispezione *post mortem* e dell'esame culturale sono procedure molto efficaci nella diagnosi di tubercolosi. Ovviamente, l'addestramento dei veterinari e l'applicazione scrupolosa delle procedure diagnostiche in allevamento e al macello sono condizioni indispensabili su cui poggia il sistema di sorveglianza attiva della tubercolosi.

La tubercolosi è una vecchia malattia per la quale, negli ultimi anni, sono stati fatti progressi nei riguardi della diagnostica molecolare, che possono essere di aiuto nella comprensione dell'evoluzione filogenetica e soprattutto dei collegamenti epidemiologici che si possono evidenziare con l'identificazione, la mappatura e la comparazione dei ceppi circolanti sul nostro territorio e quelli in altri paesi.

Il controllo di qualità *in itinere* della diagnosi di tubercolosi bovina in tutti i suoi aspetti è un'azione fondamentale nel mantenimento di un efficace programma di eradicazione, soprattutto nelle sue fasi finali. Infatti, il calo "fisiologico" di attenzione nei sistemi di sorveglianza delle malattie già eradicato o sotto controllo è inconfutabile e può portare a spiacevoli, non imprevedibili, recrudescenze. Per evitare ciò, ogni paese organizza corsi sulle emergenze e si prepara, sia dal punto di vista tecnico sia come risorse umane.

Un altro punto importante nella tubercolosi bovina è che il gold standard diagnostico per confermarla con certezza è l'isolamento di *M. bovis*; per questa ragione, il mancato

reperito anatomico-patologico macroscopico in sede di ispezione *post mortem*, la cui presenza, invece, è vista comunemente da molti colleghi veterinari e dagli allevatori come la "prova inconfutabile" di tubercolosi, altrimenti dubbia, è da considerare come un test diagnostico come altri, dotato per di più di scarsa sensibilità.

Tanto è vero che la normativa comunitaria in tema di profilassi della tubercolosi bovina impone l'apertura del focolaio ogni qualvolta vi sia isolamento del germe.

1. Veterinario Dirigente Osservatorio Epidemiologico Veterinario Regionale della Lombardia, c/o IZS Brescia
2. Direttore Sanitario Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia ed Emilia Romagna

